

На правах рукописи

Белов Андрей Александрович

Морфо-функциональные показатели эритроцитов при технологическом стрессе и коррекции состояния организма коров низкоинтенсивным лазерным излучением

1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена на кафедре физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Научный руководитель:

Дерюгина Анна Вячеславовна,
доктор биологических наук, доцент, зав.
кафедрой физиологии и анатомии Института
биологии и биомедицины ФГАОУ ВО
«Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты:

Боголюбова Надежда Владимировна,
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник, зав. отделом физиологии и
биохимии сельскохозяйственных животных
ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр животноводства – ВИЖ имени
академика Л.К. Эрнста»

Востроилова Галина Анатольевна,
доктор биологических наук, главный научный
сотрудник лаборатории доклинических
исследований и моделирования
биологических систем ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский
ветеринарный институт патологии,
фармакологии и терапии»

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет им. В.И. Вернадского»

Защита диссертации состоится «02» марта 2023 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2022/1307/diss-Belov-1307.pdf>

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Акинчиц Е. К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В современной биологии одной из актуальных проблем является изучение различных аспектов влияния стресса на животных и человека. Стресс оказывает генерализованное повреждающее воздействие на организм, вызывает развитие стресс-индуцированных нарушений различных видов обмена (Донник, 2021; Tallo-Parra et al., 2017; Elsasser et al., 2020). Значимым является изучение функциональных свойств эритроцитов, которые обеспечивают газовый, аминокислотный, водно-солевой, электростатический обмены, вносят существенный вклад в реологию и микроциркуляцию крови (Romero, 2004; Mormede et al., 2007), что сказывается на кровоснабжении различных органов и тканей (Новицкий, 2004; Ибадуллаева и соавт., 2018; Nunomura, Takakuwa, 2006; Kim et al., 2009). Структурные перестройки эритроцитов являются эффективным механизмом регуляции самых разнообразных процессов в норме и при патогенезе различной этиологии, обеспечивая целенаправленный отклик организма на действие внешних и внутренних факторов (Мороз и соавт., 2012; Башук и соавт., 2014; Боронихина, 2021). Кроме того, мембранные и метаболические процессы, протекающие в эритроцитах, служат интегральным отражением реакции клеток на уровне целостного организма (Михайлис, 2009; Siems, 2000).

Особую значимость проблема стресса приобретает в животноводстве. Технологический стресс, возникающий под влиянием факторов, связанных со способами содержания крупного рогатого скота и элементами технологии, оказывает неблагоприятное влияние на здоровье животных и их продуктивность (Ермакова, 2014; Трубников, 2015; Бусловская, 2019; Шамонина, 2021). Технологический стресс влечет потерю живой массы коров на 15-18%, молочной продуктивности на 10-30%, снижается резистентность животных (Волчков, 2000; Юрьев, 2007; Ярован, 2008; Ермакова, 2009; Улитко и соавт., 2019; Ламонов, 2022).

Для повышения защитных сил организма предложен широкий арсенал антистрессовых препаратов: стресс-протекторы (нейролептики, транквилизаторы, седативные средства), адаптагены, витаминные препараты (Ажмулдинов и соавт., 2017; Ляпин и соавт., 2019). Однако проблемами, возникающими при их использовании, являются непродолжительность действия, побочное влияние, возможное накопление этих веществ или продуктов их распада в организме животного. В связи с этим, поиск альтернативных безвредных для организма антистрессовых воздействий остается одной из главных задач в профилактике стрессов.

На сегодняшний день низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) широко применяется в различных областях ветеринарии (Балковой и соавт., 1998; Иноземцев, 2000; Бурдов и соавт., 2001; Казеев, 2002; 2003; Макаримов, 2002). Показано, что НИЛИ повышает естественную резистентность телят (Пайтерова и соавт., 2009; Дерюгина и соавт., 2018), благотворно влияет на ослабленных животных с более низкой массой тела (Сержантова, 2009; 2011), стимулирует

активность гонадотропных желез (Романова, 2013; Беккулиев и соавт., 2014). НИЛИ используется для профилактики и лечения послеродового эндометрита, мастита, оказывает обезболивающее действие (Романова и соавт., 2013; Грига и соавт., 2014; Чекрышева и соавт., 2021; Alexandratou, 2003; Luo G-Y. et al., 2012). При этом единых протоколов использования НИЛИ, так же как и целостной концепции механизмов действия НИЛИ на организм животных не разработано. Внедрение НИЛИ в животноводческую практику идет преимущественно эмпирическим путем. Изучение механизмов действия НИЛИ на системном и клеточном уровне позволит расширить сферы его применения и актуально для дальнейшего развития науки.

Целью исследования ставилось изучение механизмов морфо-метаболических изменений эритроцитов периферической крови коров при стрессе и действии низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в качестве корректора функционального состояния организма животных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать динамику морфо-метаболических, электрокинетических показателей эритроцитов при технологическом стрессе и действии НИЛИ на фоне технологического стресса у высокопродуктивных коров.

2. Изучить влияние НИЛИ *in vitro* на показатели фазовой микроморфометрии и морфо-функциональные, электрокинетические показатели эритроцитов в условиях действия адреналина, кортизола, блокаторов α - и β -адренорецепторов, глутаровой фиксации клеток.

3. Установить возможность использования НИЛИ в активации адаптационных реакций организма животных к технологическому стрессу.

Научная новизна исследования.

При выполнении диссертационного исследования впервые:

- проведена комплексная фазовая микроморфометрия эритроцитов и их структурно-функциональных показателей при действии НИЛИ на фоне технологического стресса у коров;

- показано, что эффекты воздействия НИЛИ на эритроциты коров *in vitro* определяются функционально-метаболическим состоянием эритроцитов и доказано влияние НИЛИ через различные регуляторные системы клеток;

- выявлена зависимость фазовой высоты и фазового диаметра эритроцитов от их окислительного и метаболического состояния, что позволяет в скрининговом режиме оценить функциональное состояние эритроцитов;

- определено, что непрерывный режим воздействия НИЛИ с длиной волны 830 нм в области уха в течение 5 и 15 минут ограничивает влияние технологического стресса на гематологические, биохимические, окислительные показатели периферической крови коров, молочную продуктивность и качество молока, более выражено при 15-минутном воздействии.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Получены новые данные, доказывающие зависимость реализации действия НИЛИ от состояния эритроцитов: в условиях действия адреналина при истощении клеток действие НИЛИ не эффективно, тогда как влияние НИЛИ на фоне

кортизола повышениет адаптационные резервы клеток, что реализуется в росте энергетических, электрокинетических характеристик и снижении процессов липопероксидации.

Установлена взаимосвязь между оптико-геометрическими и структурно-метаболическими показателями эритроцитов. Доказанная возможность использования интерференционной микроскопии для диагностики функционального состояния эритроцитов, связана с внедрением в практику сельского хозяйства и ветеринарной медицины новейших методов исследования, что имеет первостепенное значение для развития отрасли животноводства.

Использование НИЛИ для предупреждения и компенсации нарушений, возникающих при технологическом стрессе у коров, позволяет повысить молочную продуктивность животных.

Основные результаты работы включены в соответствующие разделы спецкурсов и используются в ходе выполнения выпускных квалификационных работ студентами кафедры.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фазовые изображения, мембранные показатели и функциональное состояние эритроцитов зависят от действия технологического стресса и НИЛИ.

2. Влияние адреналина, кортизола, блокаторов α - и β - адренорецепторов, глутаровой фиксации эритроцитов модулирует НИЛИ-индуцированные эффекты фазометрии и метаболизма эритроцитов *in vitro*.

3. Скрининговая диагностика состояния эритроцитов и оценка влияния НИЛИ на эритроциты реализуется путем анализа фазового диаметра и фазовой высоты эритроцитов крупного рогатого скота.

4. НИЛИ является эффективным средством коррекции технологического стресса у крупного рогатого скота, что проявляется на клеточном и системном уровне и определяет повышение молочной продуктивности животных.

Степень достоверности и апробации полученных результатов.

Достоверность научных результатов и выводов, полученных в работе, обусловлена использованием методов оптической визуализации биологических объектов. Полученные данные подтверждены общепринятыми методами и соответствуют теоретическим выводам и обоснованиям.

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2018, 2019; XV Международной научно-практической конференции «Агропромышленный комплекс: состояние, проблемы, перспективы», 2020; Международной научно-практической конференции «Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК», посвященной 100-летию кафедры фармакологии и токсикологии СПбГУВМ – Санкт-Петербург, 2021; Международной научно-практической конференции «Наука, технологии, кадры – основы достижений прорывных результатов в АПК», 2021; 74-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых, посвященной памяти проф. А. П. Веселова «Биосистемы: организация, поведение, управление», 2021; Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием «Стресс и здоровье человека», Н. Новгород, 2021; 75-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Н. Новгород, 2022 г.

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в проведении экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах. Лазерная интерференционная микроскопия выполнена совместно с начальником отделения медицинских изделий и микроскопии АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э. С. Яламова» к.физ.-мат.н. Игнатьевым П. С. и ведущим научным сотрудником научно-исследовательской лаборатории Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М. Ф. Владимирского к.б.н. Метелиным В. Б.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 37 печатных работ, из них 8 – в изданиях, рецензированных ВАК Министерства образования и науки РФ и 7 – в международной реферативной базе данных Scopus/WoS. Получен патент на изобретение РФ №2732759 от 22.09.2020 «Способ оценки стресс-реакции организма крупного рогатого скота».

Конкурсная поддержка работы. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-316-90066.

Объем и структура диссертации. Научная работа состоит из введения, глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждения», выводов, рекомендаций производству, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 122 страницах, иллюстрирована 11 рисунками и 20 таблицами. Список используемой литературы содержит 312 источников, из которых 96 источников иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: структурно-функциональная организация эритроцитов, особенности функционирования эритроцитов в условиях стресса; технологический стресс высокопродуктивных сельскохозяйственных животных, его влияние на физиологические особенности и продуктивность; низкоинтенсивное лазерное излучение, его использование в ветеринарии и животноводстве.

В главе 2 перечислены использованные в работе объекты исследований, реактивы, оборудование и описаны методики исследований.

В соответствии с целью и задачами исследование проведено *in vivo* и *in vitro*.

Исследование *in vivo* проведено на физиологически здоровых высокопродуктивных коровах голштинизированной черно-пестрой породы, содержащихся в производственных условиях животноводческих комплексов Нижегородской области. Исследование выполнено в зимний период года, наиболее стрессогенный. Животные содержались в типовом коровнике в течение

всего года и получали одинаковый по структуре и питательности рацион, принятый в хозяйстве и соответствующий нормам кормления. Нормы кормления и содержания животных соответствовали утвержденным рекомендациям (А.П. Калашников и соавт., 2003).

Исследование проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях (ETS №123, Страсбург, 1986) и Приказа МЗ РФ № 708 Н от 28 августа 2010 г.

Коровы были разделены на четыре группы по принципу аналогов (порода, живая масса, возраст): I группа – интактная; II группа – животные, после технологического стресса; III группа, животные, которым воздействовали НИЛИ в области уха 5 минут; IV группа, животные, которым воздействовали НИЛИ в области уха 15 минут. Курс физиопроцедур для III и IV группы составил 7 дней после технологического стресса. Всего в опытах было задействовано 48 голов крупного рогатого скота, по 12 голов в каждой группе. В качестве технологического стресса рассматривали совокупность воздействий: перегруппировку животных и смену обслуживающего персонала, действующих ежедневно в течение 7 суток.

Взятие крови из яремной вены коров проводили в утреннее время до раздачи кормов в динамике после технологического стресса. Исследовали морфо-метаболические характеристики эритроцитов, гематологические и биохимические показатели крови через 1 час, 1, 7 сутки после технологического стресса; молочную продуктивность коров до и через 30 суток после технологического стресса.

В качестве источника НИЛИ использовали автономный лазерный душ «МарсИК» (НПО "Петролазер", Санкт-Петербург) с длиной волны 830 нм, мощностью 90 мВт, потоком падающей энергии 5 мВт/см².

Для выявления роли отдельных структурных компонентов эритроцитов в реализации эффектов НИЛИ проведено исследование *in vitro*. Объектом исследования были предварительно отмытые эритроциты крови коров без стрессового воздействия и эритроциты животных, перенесших стресс.

Энергетическую плотность (ЭП) рассчитывали по формуле (С. В. Москвин, 2016): $D = P * t \text{ облучения} / S$, где P – мощность (Вт) прибора; t – время экспозиции (с); S – площадь облучаемой поверхности (см²).

ЭП для коров при 5 мин составила 1,35 Дж/см² и 15 мин – 4,05 Дж/см²;

ЭП для клеток при 5 мин – 1,38 Дж/см² и при 15 мин – 4,12 Дж/см².

Облучение клеток крови НИЛИ (в течение 5 и 15 минут) проводили в чашках Петри диаметром 5 см, на расстоянии 1 см от поверхности клеточных мембран.

Влияние симпато-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой систем на морфо-функциональные свойства эритроцитов и их вклад в реализацию действия НИЛИ оценено на эритроцитах, предварительно инкубированных с адреналином (1×10^{-9} г/мл) и кортизолом (5×10^{-7} г/мл) и последующем воздействии НИЛИ.

Для исследования механизмов морфо-метаболической модификации

эритроцитов при действии стресса и НИЛИ использована глутаровая фиксация эритроцитов (по методике Walter, Krob, 1989), позволяющая оценить роль белок-липидной структуры мембраны эритроцитов в реализации эффектов стресса и НИЛИ и инкубация эритроцитов с блокатором α -адренорецепторов – фентоламином (1×10^{-9} г/мл) и β -адренорецепторов – пропранололом (1×10^{-9} г/мл) позволяющая выявить значение адренорецепторов в реализации путей сигнальной трансдукции при действии НИЛИ.

Время воздействия препаратов составило 30 мин, за исключением действия адреналина, действие которого составило 15 мин. В каждой серии было по 20 проб.

Методы исследования.

Изучение комплексной фазометрии эритроцитов методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии проводили на лазерном микроскопе МИМ-340 (Уральский оптико-механический завод им. Э. С. Яламова, Россия), лазер с длиной волны 650 нм и объектив с увеличением 30 ($NA=0,65$), разрешение по поверхности — до 15 нм, разрешение по вертикали — 0,1 нм. Для захвата изображений применяли CCD видеокамеру VS-415U (НПК «Видеоскан», Россия) с разрешением 782x582 пикселей. Обработку полученных изображений проводили в программе МИМ Visualizer 1,0 (MIM Software Inc., США).

Для анализа функционально-метаболического состояния эритроцитов исследовали электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) методом микроэлектрофореза (А. V. Deryugina et al., 2017), концентрацию малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах и крови по реакции с тиобарбитуровой кислотой (В. М. Лившиц, 2007), в эритроцитах определяли концентрацию АТФ, 2,3 ДФГ неэнзиматическим методом (И. Л. Виноградова и соавт., 1980; G. A. Boyarinov et al., 2017), активность Na^+/K^+ -АТФазы оценивали по приросту неорганического фосфата (А. М. Казеннов и соавт., 1984), определяли концентрацию восстановленного глутатиона (G. L. Ellman, 1959), активность супероксиддисмутазы (Т. В. Сирота, 2016), активность каталазы (М. А. Королюк, 1988).

В крови регистрировали содержание общего белка, альбуминов, глобулинов, глюкозы, мочевины, креатинина, ферментов аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ), холестерина, ионов кальция и фосфора на автоматическом биохимическом анализаторе ChemWell 2900 (Awareness Technology, США). Концентрацию эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов измеряли на гематологическом анализаторе Гемалайт 1270 (Dixion, Россия). Содержание кортизола в сыворотке крови определяли на автоматическом ИФА анализаторе (Эволис Твин Плюс, Россия).

Молочную продуктивность животных контролировали по результатам молочной продуктивности, определяли жирномолочность и белковомолочность с помощью ультразвукового анализатора «Лактан 1-4» (Россия).

Статистический анализ данных.

Полученные экспериментальные данные рассчитывали, как среднее значение (Mean) с ошибкой среднего (SEM). Сравнительный анализ данных

проводили с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0. и Microsoft Excel. Для проверки гипотезы о виде распределения применялся метод Шапиро-Уилка. Изучение статистических закономерностей осуществлялось с применением параметрического (критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони) метода статистики. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена. За величину уровня статистической значимости различий принимали $p \leq 0,05$.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

1. Действие технологического стресса и НИЛИ на морфо-функциональное состояние эритроцитов коров в условиях *in vivo*

Исследование морфологических характеристик эритроцитов периферической крови коров показало, что при технологическом стрессе регистрировалось развитие пойкилоцитоза, анизоцитоза на протяжении всего срока наблюдения (рис. 1). В группах с действием НИЛИ на фоне технологического стресса через час – сутки наблюдалось снижение количества морфологически измененных форм клеток, выявленных при стрессе (рис. 1 А) и восстанавливалось количество нормоцитов (рис. 1 Б).

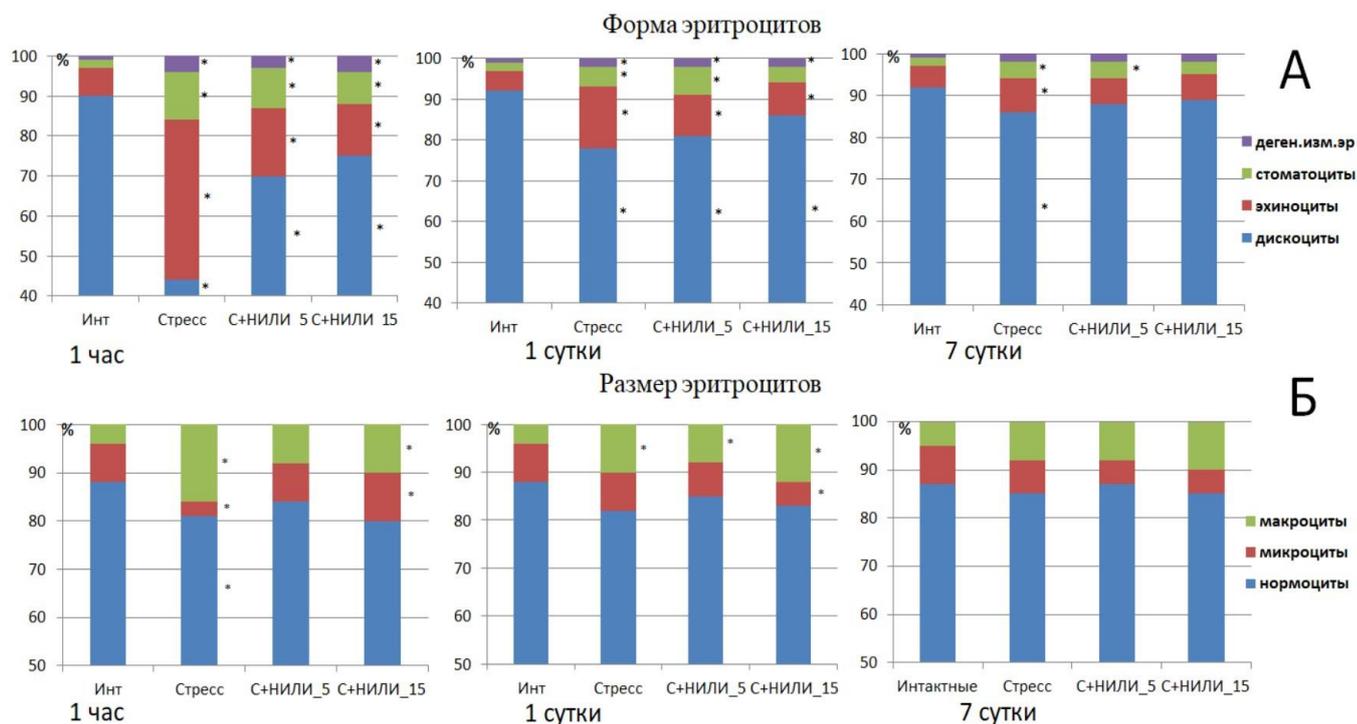


Рис. 1. Морфология эритроцитов коров при технологическом стрессе и действии НИЛИ *in vivo*

Примечание: А – форма эритроцитов, Б – размер эритроцитов;

С+НИЛИ_5 – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 5 минут, С+НИЛИ_15 – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 15 минут, * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы.

Фазовые изображения эритроцитов животных после технологического стресса, полученные методом лазерной интерференционной микроскопии характеризовались повышенными оптико-геометрическими показателями: фазовый диаметр сохранялся повышенным относительно значений интактных клеток на протяжении всего срока регистрации, фазовая высота – на час – сутки после технологического стресса (рис. 2). Действие НИЛИ на фоне стресса вызывало сохранение повышенного диаметра эритроцитов до первых суток исследования, фазовая высота с первого часа регистрации значимо не отличалась от значений интактной группы.

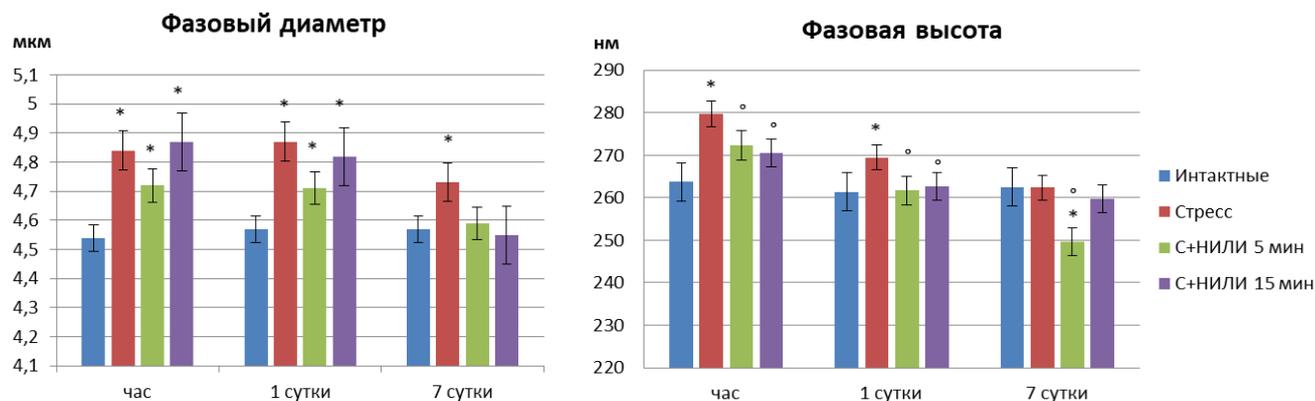


Рис. 2. Оптико-геометрические размеры эритроцитов коров на фоне стресса и воздействия НИЛИ *in vivo*

Примечание: С+НИЛИ_5 мин – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 5 минут, С+НИЛИ_15 мин – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 15 минут, * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы; ° – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям стрессированных животных.

Поскольку морфологию эритроцитов определяет структура мембраны, которая зависит от функциональной активности клеток (Емельянов и др., 2016), далее был проведен анализ ЭФПЭ, концентрации МДА, активности антиоксидантной системы и метаболизма эритроцитов.

При технологическом стрессе регистрировалось уменьшение ЭФПЭ, снижение концентрации АТФ, восстановленной формы глутатиона, рост активности СОД на час – сутки относительно значений интактной группы, тогда как концентрация 2,3 ДФГ была повышена, активность Na^+/K^+ -АТФазы снижена на всех этапах исследования (рис. 3, табл. 1).

Действие НИЛИ вызывало рост ЭФПЭ, который превышал уровень значений интактной группы на протяжении всего срока наблюдения, концентрация МДА восстанавливалась к первому часу эксперимента, АТФ – к первым суткам, содержание 2,3 ДФГ и активность Na^+/K^+ -АТФазы восстанавливались к 7 суткам до значений интактной группы (рис. 3). К первым суткам значительно возрастала активность антиоксидантных систем эритроцитов относительно значений интактной группы животных и животных после технологического стресса (табл. 1).

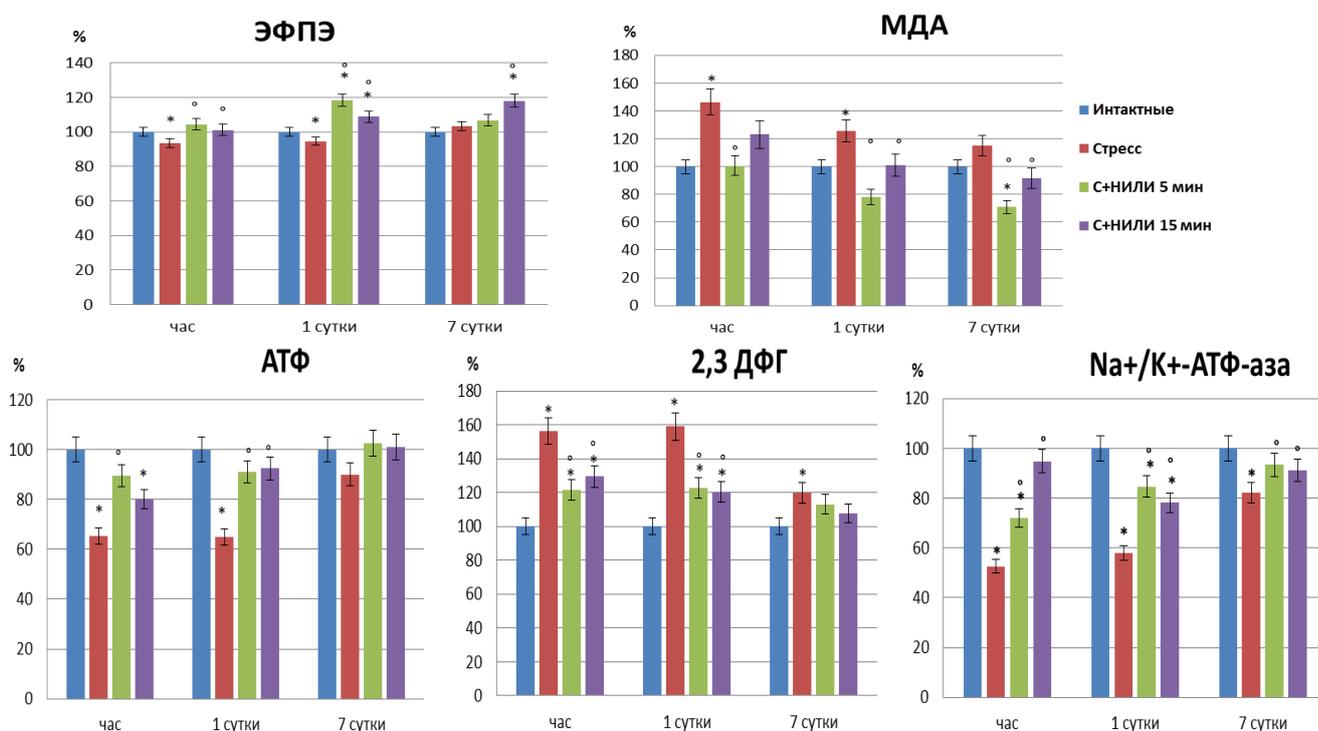


Рис. 3. Изменение функциональных показателей эритроцитов крови коров на фоне стресса и воздействия НИЛИ.

Примечание: С+НИЛИ_5 мин – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 5 минут, С+НИЛИ_15 мин – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 15 минут, * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы, ° – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям стрессированных животных.

Таблица 1

Изменение антиоксидантных показателей эритроцитов крови коров на фоне стресса и воздействия НИЛИ в экспериментах *in vivo*

Группы животных	Этапы исследования		
	час	1 сутки	7 сутки
Активность СОД, ед. акт. /мг гемоглобина			
Интактные	4,81±0,53	4,83±0,49	4,89±0,46
Стресс	5,48±0,23	5,81±0,26*	5,68±0,27
Стресс+НИЛИ 5 мин	5,54±0,29	5,89±0,29*	4,98±0,41
Стресс+НИЛИ 15 мин	6,13±0,49*°	6,73±1,02*°	4,98±0,41
Активность каталазы, мкМ H ₂ O ₂ / л·мин·10 ³			
Интактные	40,45±2,18	40,28±2,14	38,98±4,29
Стресс	39,51±2,67	39,69±3,60	39,68±4,77
Стресс+НИЛИ 5 мин	40,48±1,38	45,16±1,23*°	41,32±3,33
Стресс+НИЛИ 15 мин	41,49±1,84	44,29±1,48*°	40,29±4,15
Восстановленный GSH, мкмоль/мл			
Интактные	1,55±0,10	1,53±0,17	1,55±0,17
Стресс	1,33±0,07*	1,39±0,08	1,42±0,08
Стресс+НИЛИ 5 мин	1,54±0,16	1,60±0,15*°	1,52±0,19
Стресс+НИЛИ 15 мин	1,52±0,15	1,61±0,12*°	1,56±0,16

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к значениям интактной группы, ° – $p < 0,05$ по отношению к значениям стрессированных животных.

Корреляционный анализ выявил высокую зависимость фазового диаметра эритроцитов от интенсивности метаболизма во всех экспериментальных группах (табл. 2). Показатель фазового диаметра клеток находился в отрицательной статистической взаимосвязи с концентрацией АТФ и положительной – с содержанием 2,3 ДФГ. Для фазовой высоты эритроцитов установлена корреляция с интенсивностью липопероксидации: прямая корреляция показана с концентрацией МДА в клетках во всех исследуемых группах.

Таблица 2

Корреляционная зависимость метаболических и окислительных показателей от фазовых параметров эритроцитов у коров при стрессе и действии НИЛИ (n=40)

Группа животных		АТФ	2,3 ДФГ		МДА
Интактные	Фазовый диаметр	-0,86 **	0,81 **	Фазовая высота	0,82 **
Стресс		-0,98 *	0,99 *		0,97 *
Стресс+НИЛИ 5 мин		-0,92 **	0,96 *		0,95 **
Стресс+НИЛИ 15 мин		-0,97 *	0,96 *		0,97 *

Примечание: «*» - $p < 0,01$, «**» - $p < 0,05$.

Таким образом, нарушение морфо-функциональных параметров эритроцитов периферической крови коров, вызванное действием технологического стресса, нивелировалось при использовании НИЛИ. Наиболее значимое восстановление морфо-метаболических показателей эритроцитов стрессированных животных, наблюдалось при действии НИЛИ в области уха в течение 15 минут.

При этом электромагнитная природа НИЛИ предполагает возможность его взаимодействия с множеством регуляторных механизмов в живых системах, недостаточно ясна роль внутриклеточных сигнальных систем в реализации эффектов НИЛИ. Далее были проведены исследования действия НИЛИ на изолированные эритроциты для выявления непосредственного влияния НИЛИ на клетки.

2. Действие технологического стресса и НИЛИ на морфо-функциональные характеристики эритроцитов крови коров в условиях *in vitro*

Визуализация эритроцитов крови нестрессированных коров методом лазерной интерференционной микроскопии показала, что клетки имели двояковогнутую форму, относительно гладкую поверхность с незначительной неоднородностью. Действие НИЛИ на эритроциты нестрессированных коров не вызывало изменение характерной дискоидальной формы эритроцитов, но на поверхности регистрировались «шероховатости» с выростами и выпуклостями (рис. 4 А), фазовые характеристики значимо не изменялись относительно соответствующих показателей интактной группы. Фазовые портреты стрессированных животных характеризовались появлением значительного числа

выростов клеточной поверхности, вследствие чего эритроциты приобретали форму эхиноцитов (рис. 4 Б, В) регистрировалось статистически значимое увеличение фазовой высоты и фазового диаметра эритроцитов относительно значений тех же показателей у интактной группы животных (рис. 5Б). Воздействие НИЛИ на эритроциты стрессированных животных привело к увеличению количества дискоцитов за счет уменьшения эхиноцитов (рис. 5А), регистрировалось уменьшение фазового диаметра и фазовой высоты относительно показателей стрессированных животных (рис. 5 Б). Поверхностная архитектура характеризовалась уменьшением или полным нивелированием шероховатости поверхности клеток (рис. 4 Г). При этом сохранялись необратимо измененные эритроциты в виде стоматоцитов и дегенеративно-измененных клеток.

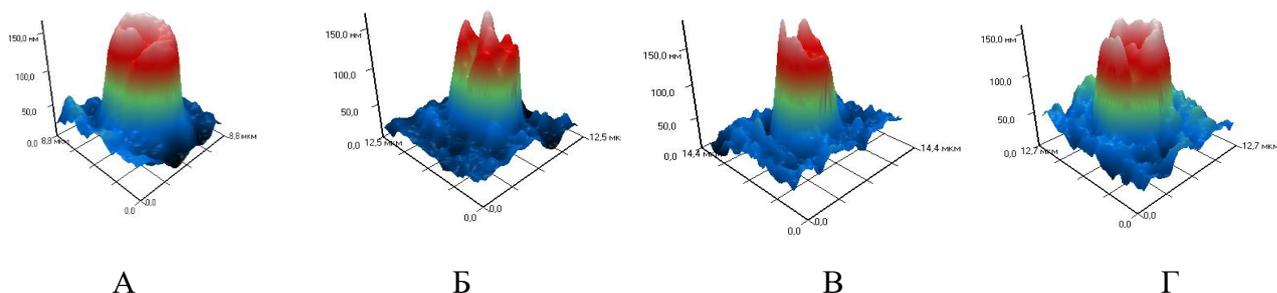


Рис. 4. Фазово-интерференционные изображения эритроцитов коров.

Примечание: А – типичные 3D-изображения эритроцитов при действии НИЛИ, Б, В – типичные 3D-изображения эритроцитов при стрессе, Г – типичные 3D-изображения эритроцитов при действии НИЛИ на фоне стресса. Среднее \pm SEM, n = 20

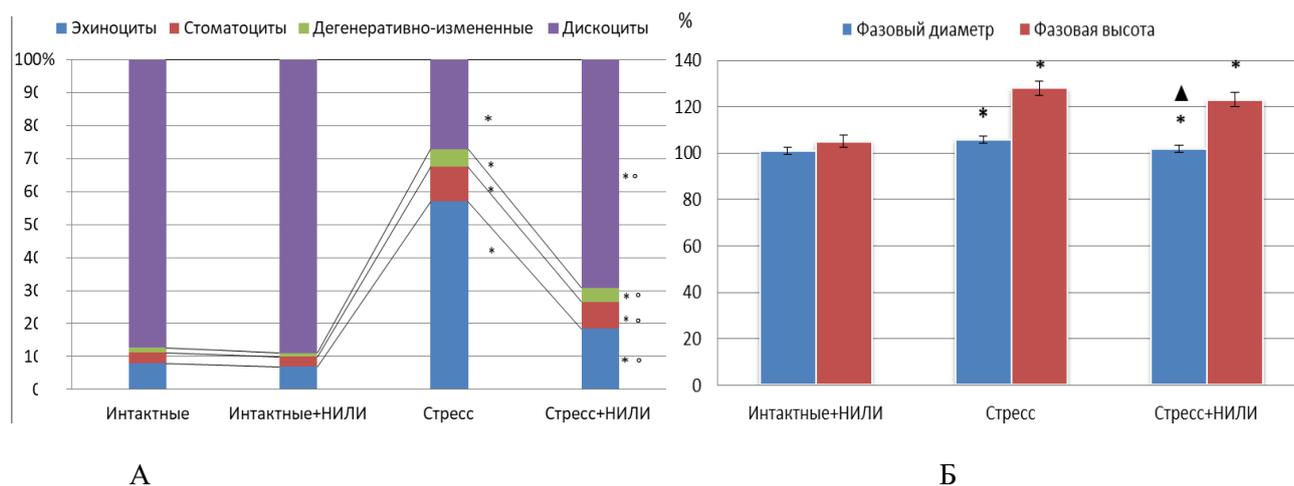


Рис. 5. Морфологические формы (А) и оптико-геометрические показатели (Б) эритроцитов коров при стрессе и воздействии НИЛИ 15 мин *in vitro*.

Примечание: рис. Б: 100% – уровень значений интактной группы (эритроциты от нестрессированных животных). * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы; ° ▲ $p \leq 0,05$ по отношению к значениям группы «стресс».

При оценке электрокинетических и метаболических показателей эритроцитов после технологического стресса было выявлено снижение ЭФПЭ, концентрации АТФ, активности Na^+/K^+ -АТФазы, увеличение концентрации МДА и 2,3 ДФГ относительно показателей интактной группы. Действие НИЛИ на

эритроциты нестрессированных коров не вызывало значимого изменения показателей. Действие НИЛИ на эритроциты от стрессированных животных увеличивало электроотрицательность, восстанавливало концентрацию АТФ, активность Na^+/K^+ -АТФазы и снижало уровень липопероксидации до показателей значений интактной группы (табл. 3).

Таблица 3

Электрокинетические, метаболические показатели и активность Na^+/K^+ -АТФазы эритроцитов исследуемых групп

Группы исследования	ЭФПЭ (мкм см $\text{V}^{-1}\text{c}^{-1}$)	МДА (нМоль/мл)	Na^+/K^+ -АТФаза (мкмоль/мл)	АТФ (мкмоль/мл)	2,3-ДФГ (мкмоль/мл)
Интактные (контроль)	1,09±0,08	2,04±0,33	2,91±0,66	1,09±0,34	3,28±0,55
Интактные +НИЛИ	1,01±0,10	2,25±0,31	2,51±0,50	1,19±0,32	4,08±0,58
Стресс	0,75±0,07*	3,37±0,45*	1,85±0,35*	0,57±0,26*	5,34±0,61*
Стресс +НИЛИ 5 мин	1,06±0,16°	2,53±0,25°	2,22±0,32°	0,89±0,25°	4,82±0,42*°
Стресс +НИЛИ 15 мин	1,09±0,11°	2,79±0,33°	2,34±0,42°	1,01±0,27°	4,66±0,38*°

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы; ° – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям группы «стресс».

Выявлена корреляционная зависимость между фазовой высотой и концентрацией МДА ($R=0,93$), а также - фазовым диаметром и концентрацией 2,3 ДФГ ($R=0,96$). Сильная обратная корреляция установлена между фазовым диаметром и концентрацией АТФ ($R=-0,91$).

Таким образом, НИЛИ проявило свое действие на эритроциты коров после технологического стресса и не оказывало влияние на эритроциты нестрессированных коров. Показано, что действие НИЛИ направлено на нормализацию клеточных функций (Karu T., 2002). Выявленное значимое воздействие НИЛИ на эритроциты стрессированных коров позволяет предположить, что действие НИЛИ определяется функциональным и метаболическим состоянием эритроцитов. Далее был проведен анализ влияния НИЛИ на фоне адреналина и кортизола – основных стресс-реализующих гормонов, а также изучен вклад различных структур эритроцитов в реализации действия НИЛИ.

3. Исследование морфоструктурного и функционального состояния модифицированных эритроцитов при стрессе и действии НИЛИ в условиях *in vitro*

Инкубация эритроцитов с адреналином определила уменьшение количества дискоцитов за счет увеличения стоматоцитов и дегенеративно-изменённых форм клеток (рис. 6). Наблюдалось увеличение сферичности клеток, количества отростков, что сопровождалось ростом фазовой высоты и фазового диаметра, увеличением концентрации МДА и снижением ЭФПЭ, концентрации АТФ, 2,3

ДФГ относительно значений интактной группы.

Действие кортизола, напротив, вызывало уменьшение эхиноцитарной трансформации клеток (рис. 6). При этом поверхность дискоцитов была неровной с выпуклостями и мезополосами, регистрировалось уменьшение фазовой высоты и фазового диаметра клеток, рост ЭФПЭ, снижение концентрации МДА и 2,3 ДФГ относительно значений интактной группы.

Использование НИЛИ на фоне инкубации эритроцитов с адреналином и кортизолом сохраняло направленность выявленных при монодействиях процессов.

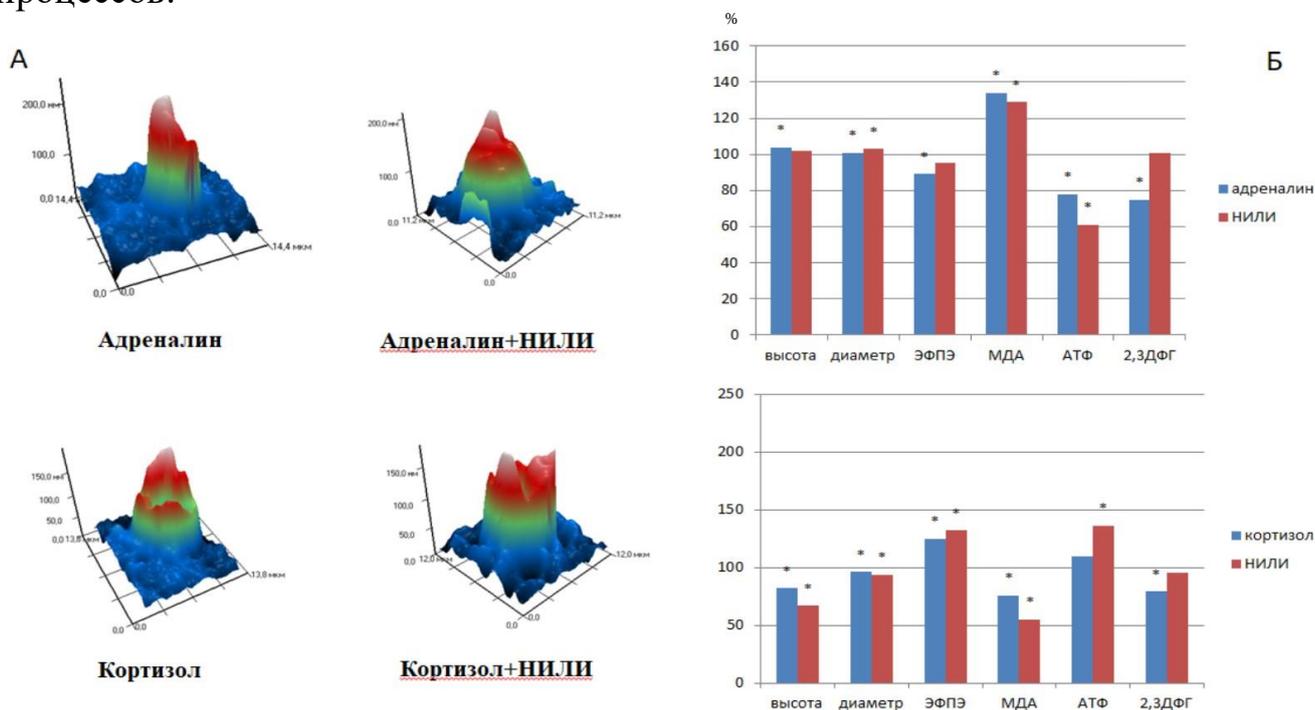


Рис. 6. Морфологические формы (А) и оптико-геометрические, электрокинетические и метаболические показатели (Б) эритроцитов коров при действии адреналина, кортизола и НИЛИ

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к значениям интактной группы, принятой за 100%

Таким образом, при действии НИЛИ на эритроциты, предварительно инкубированные с адреналином, влияние НИЛИ не ограничивало негативные эффекты адреналина, связанные с усилением окислительных процессов и истощением энергетических ресурсов. Тогда как при действии НИЛИ на эритроциты после инкубации с кортизолом, эффекты НИЛИ усиливались, что проявлялось в увеличении метаболических и электрокинетических показателей.

Для выявления роли НИЛИ через белок-липидные структуры мембраны проведены эксперименты с глутаровым альдегидом и блокаторами α - и β -адренорецепторов.

При глутаровой фиксации эффекты НИЛИ были ограничены увеличением диаметра эритроцитов и уменьшением концентрации МДА, повышенной при действии глутарового альдегида (рис. 7).

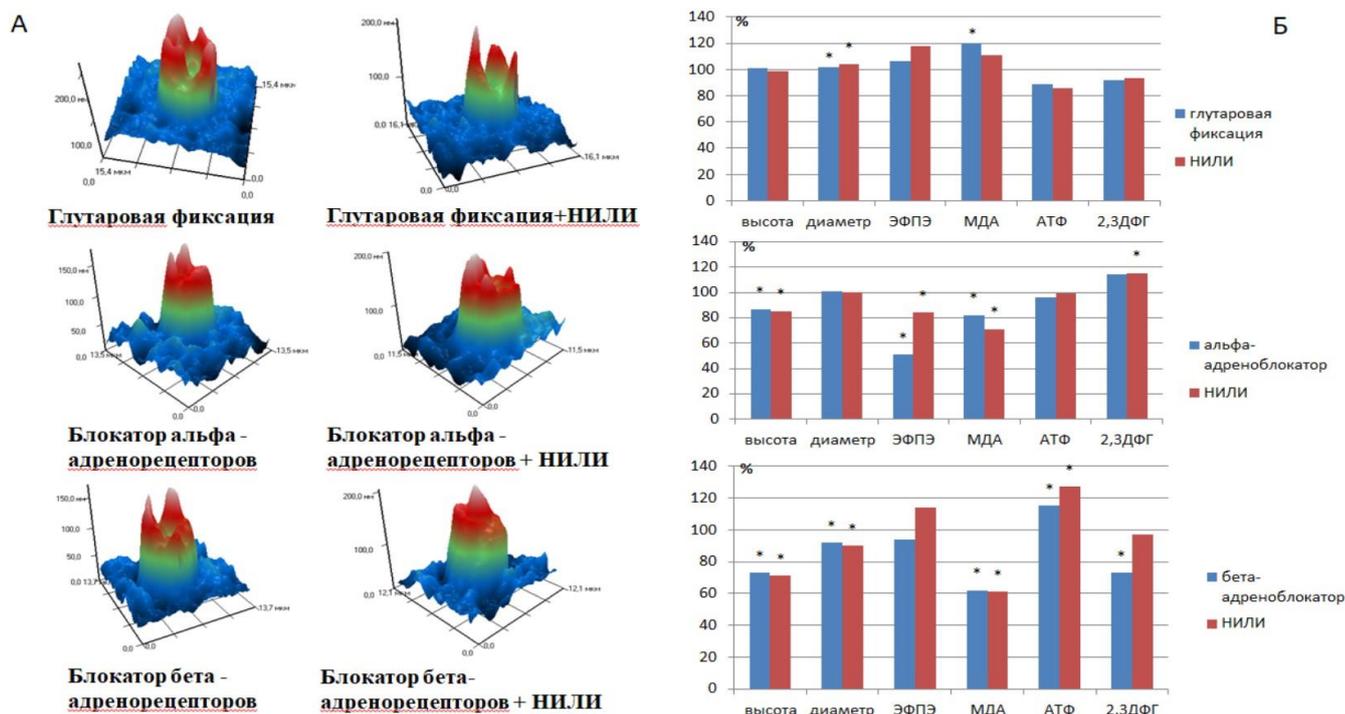


Рис. 7. Морфологические формы (А), оптико-геометрические, электрокинетические и метаболические показатели (Б) эритроцитов коров при действии блокаторов α - и β -адренорецепторов и при действии НИЛИ.

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы, принятой за 100%.

При действии НИЛИ на фоне блокаторов адренорецепторов снижалась выраженность эхиноцитарно-стомацитарной трансформации, регистрировалось снижение фазовой высоты при увеличении ЭФПЭ, концентрации АТФ / 2,3 ДФГ и снижении концентрации МДА по сравнению с моновоздействием (рис. 7).

При выявлении зависимости оптико-геометрических размеров эритроцитов в экспериментах *in vitro* было установлено, что рост фазовой высоты сопровождался увеличением концентрации МДА. Рост фазового диаметра в большей степени зависел от уменьшения концентрации АТФ и роста содержания 2,3 ДФГ в эритроцитах.

Слабая выраженность эффектов при глутаровой фиксации мембраны позволяет предположить вклад белков в реализации действия НИЛИ. Роль сигнальных белков в реализации действия НИЛИ подтверждают эксперименты с α - и β -адреноблокаторами. При этом эффекты НИЛИ через α - и β -адренорецепторы индуцируют процессы, связанные с действием фосфолипазы С, кальмодулина, протеинкиназы С, аденалатциклазы. Активация фосфолипазы С через образование диацилглицерола и инозитолтрифосфата (ИФ₃), приводит к открытию ИФ₃-зависимые Ca²⁺-каналы, входу Ca²⁺ в эритроцит и компенсаторному увеличению выхода K⁺ через Ca²⁺-зависимые калиевые каналы, что приводит к уменьшению клеточного объема. Увеличение концентрации Ca²⁺ в эритроцитах способствует активации кальмодулина. Комплекс «Ca²⁺-кальмодулин» активирует Ca²⁺-кальмодулинзависимую протеинкиназу, которая фосфорилирует белки цитоскелета. Так же определяет фосфорилирование белков

цитоскелета активация протеинкиназы С. Активация аденилатциклазы, способствует образованию цАМФ и стимуляции цАМФ-зависимой протеинкиназы, которая катализирует активацию ферментов гликолиза и АТФаз. Данные процессы вызывают восстановление объема клеток, повышение концентрации АТФ и деформации эритроцитов.

Таким образом, действие НИЛИ реализуется через различные механизмы, что, по всей видимости, повышает эффективность его влияния.

3. Влияние технологического стресса и НИЛИ на физиолого-биохимические показатели крови крупного рогатого скота

Для верификации эффективности действия НИЛИ при технологическом стрессе проведены исследования гематологических, биохимических показателей крови и качественных показателей молока при технологическом стрессе у высокопродуктивных коров голштинизированной черно-пестрой породы. Воздействие НИЛИ на фоне технологического стресса определило раннее и плавное восстановление гематологических и биохимических показателей крови (табл. 4, 5), сочетающееся с уменьшением окислительного стресса (табл. 7) по сравнению с показателями, полученными у группы животных с технологическим стрессом.

Таблица 4

Динамика гематологических показателей крови коров исследуемых групп

Группа животных	Этапы исследования	Эритроциты, *10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, *10 ⁹ /л
Интактные	час	7,35±0,32	123±2,22	6,28±0,88
	1 сутки	7,43±0,46	121±3,41	6,17±1,16
	7 сутки	7,21±0,57	124±3,74	6,37±0,76
Технологический стресс	час	6,47±0,74*	98±3,82*	10,27 ± 1,19*
	1 сутки	5,33±0,58*	99±4,74*	8,96 ± 1,09*
	7 сутки	5,84±0,84*	110±4,63*	8,77 ± 0,80*
Стресс+НИЛИ, 5 мин.	час	6,56±0,42*	111±3,43*	8,98±0,55*
	1 сутки	6,72±0,48	113±2,48*	7,54 ± 1,55
	7 сутки	6,68±0,46	116±3,81*	7,12± 1,06
Стресс+НИЛИ, 15 мин.	час	6,84±0,21*	118±3,62*	8,36±0,11*
	1 сутки	6,91±0,57	121±4,37	7,47 ± 1,13
	7 сутки	7,01±0,46	125±3,52	6,45± 1,25
Норма по Кондрахину, 2004		5–7,5	99–129	4,5–12,0

Примечание: * – p≤0,05 по отношению к значениям интактной группы.

Таблица 5

Динамика биохимических показателей крови коров исследуемых групп

Группа животных	Общий белок, г/л	Альбумины, %	Глобулины, %			Холестерол, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Мочевина, ммоль/л	АЛТ, МЕ/л	АСТ, МЕ/л	Креатинин, ммоль/л	2+, Са ммоль/л	P, ммоль/л
			a	b	γ								
1 час													
интактная	76± 1,2	45± 1,4	12± 1,2	13± 1,3	30± 2,1	3,07± 0,08	2,29± 0,08	4,2± 0,09	35± 1,5	75± 2,5	89± 4,1	3,11± 0,18	1,55 ± 0,13
стресс	74± 1,4*	42± 1,3*	11± 1,3	17± 1,1*	30± 2,2	2,04± 0,07*	4,06± 0,03*	3,5± 1,1	38± 1,2*	89± 2,2*	42± 5,6*	2,51 ± 0,22*	1,47 ± 0,15
стресс + НИЛИ, 5 мин	73± 1,3*	43± 1,1	12± 1,5	16± 1,3*	29± 1,8	2,10± 0,07*	3,99± 0,05*	3,9± 1,0	37± 1,2	86± 2,0*	56± 4,4*	2,62 ± 0,17*	1,45 ± 0,14
стресс + НИЛИ, 15 мин	71± 1,9**	43± 1,7	12± 1,7	16± 1,1*	29± 2,3	2,07± 0,09*	4,09± 0,04*	3,7± 1,2	37± 1,7*	87± 2,1*	70± 5,7*	2,71 ± 0,11*	1,45 ± 0,12
1 сутки													
интактная	77± 1,6	47± 1,4	9± 1,7	10± 1,3	34± 2,4	3,07± 0,08	2,29± 0,08	4,2± 0,09	30± 1,7	74± 2,3	90± 4,4	3,03 ± 0,25	1,59 ± 0,17
стресс	70± 1,6*	42± 1,1*	10± 1,4	16± 1,7*	32± 2,6	2,11± 0,05*	4,12± 0,07*	3,6± 1,9	37± 1,6*	83± 2,3*	52± 5,7*	2,56 ± 0,13*	1,56 ± 0,25
стресс + НИЛИ, 5 мин	75± 1,3**	46± 1,2**	9± 1,6	11± 1,2	34± 2,0	2,56± 0,07**	3,22± 0,10**	3,8± 1,6*	34± 1,5*	82± 3,0*	76± 5,0**	2,90 ± 0,21	1,58 ± 0,20
стресс + НИЛИ, 15 мин	74± 1,9**	45± 1,6**	10± 1,5	10± 1,7	35± 2,2	2,72± 0,08**	3,07± 0,11**	3,9± 1,7	35± 1,3*	84± 3,3*	82± 5,4**	2,86 ± 0,11	1,92 ± 0,27
7 сутки													
интактная	78± 1,6	45± 1,4	9± 1,6	13± 1,7	33± 2,9	3,08± 0,02	2,52± 0,08	4,2± 0,09	30± 1,2	74± 2,3	89± 4,3	3,06 ± 0,21	1,82 ± 0,21
стресс	74± 1,4*	38± 2,4*	10± 1,4	12± 1,4	30± 2,1	3,13± 0,07	2,94± 0,06*	4,6± 1,7	32± 1,5	78± 4,7	87± 4,7	2,88 ± 0,14	1,51 ± 0,19
стресс + НИЛИ, 5 мин	76± 1,6	44± 1,8**	10 ± ±1,0	13± 1,5	33± 1,6	3,10± 0,04	2,55± 0,10**	4,4± 1,8	32± 1,5	74± 3,2	87± 4,3	2,99 ± 0,20	1,64 ± 0,18
стресс + НИЛИ, 15 мин	77± 1,3**	44± 1,6**	10 ± ±1,8	12± 1,9	34± 2,6	3,16± 0,06	2,47± 0,15**	4,9± 1,1	33± 1,7	75± 3,4	86± 4,4	2,95 ± 0,16	1,84 ± 0,16

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы; ** – $p \leq 0,05$ по отношению к группе технологический стресс.

Гормон коры надпочечников – кортизол оказывает влияние на все виды обмена веществ. Увеличение синтеза и выделение кортизола, является одним из объективных маркеров стресс-реакции организма (Mormede et al., 2007).

В результате проведенного исследования установлено, что развивающаяся стресс-реакция проявлялась резким увеличением уровня кортизола в крови коров, при этом максимальных значений данный показатель достигал в первые сутки воздействия стресс-факторов (табл. 6). Следовательно, первые сутки являются наиболее критическими при технологическом стрессе у коров. Технологический стресс отразился и на функционировании системы антиоксидантной защиты организма коров, что проявилось снижением уровня восстановленного глутатиона. Депрессивное состояние антиоксидантной системы сопровождалось значительным увеличением концентрации МДА (табл. 7).

Таблица 6

Уровень кортизола (нмоль/л) в крови коров исследуемых групп

Показатель	Интактные	Стресс	Стресс+ НИЛИ 5 мин	Стресс+ НИЛИ 15 мин
до начала эксперимента	18,55±2,34	18,25±2,86	16,38±3,74	19,21±1,97
1 сутки	16,36±2,43	42,17±4,55*	43,54±3,19*	38,24±4,18*
3 сутки	17,44±1,78	32,20±2,06*	36,18±4,27*	26,25±4,11*
7 сутки	17,38±2,89	18,43±1,69	18,47±2,74	20,41±4,21

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям до стресса.

Применение НИЛИ для коррекции стрессовых состояний и профилактики негативных последствий технологического стресса при 15 минутном воздействии положительно отразилось на уровне кортизола, что сочеталось с нормализацией показателей свободно-радикального окисления и антиоксидантной защиты (табл. 6, 7).

Таблица 7

Содержание малонового диальдегида (нМоль/мл) и восстановленного глутатиона (нМоль/мл) в крови коров исследуемых групп

Группы животных	Этапы исследования		
	час	сутки	7 сутки
МДА, (нМоль/мл)			
Интактные	5,91±0,023*	6,27 ± 0,01	6,45 ± 0,11
Стресс	7,82±0,021*	7,98 ± 0,03*	7,07 ± 0,01*
Стресс+НИЛИ 5 мин	6,82±0,025*	6,62 ± 0,06* **	5,35 ± 1,78
Стресс+НИЛИ 15 мин	6,34±0,026*	7,19 ± 0,19* **	5,96 ± 0,21
Восстановленный GSH, (нмоль/мл)			
Интактные	18,1±1,83	17,3±1,64	18,4±1,65
Стресс	15,4±1,35*	14,7±2,03*	17,2±1,74
Стресс+НИЛИ 5 мин	16,2±1,54*	16,3±1,38* **	18,7±1,28
Стресс+НИЛИ 15 мин	13,8±1,72* **	15,7±2,04* **	17,7±1,64

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактной группы;

** – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям стрессированной группы, $p \leq 0,05$.

Физиолого-биохимические показатели крови подтверждают адаптирующую роль НИЛИ в данном диапазоне и дизайне воздействия к действию технологического стресса организма коров.

На фоне восстановления процессов метаболизма, НИЛИ изменяло показатели молочной продуктивности крупного рогатого скота, что выражалось в увеличении относительной доли белка и лактозы относительно группы животных после технологического стресса (рис. 8). Доказано проявление отдаленных эффектов действия НИЛИ: повышение молочной продуктивности регистрировалось через месяц после воздействия.

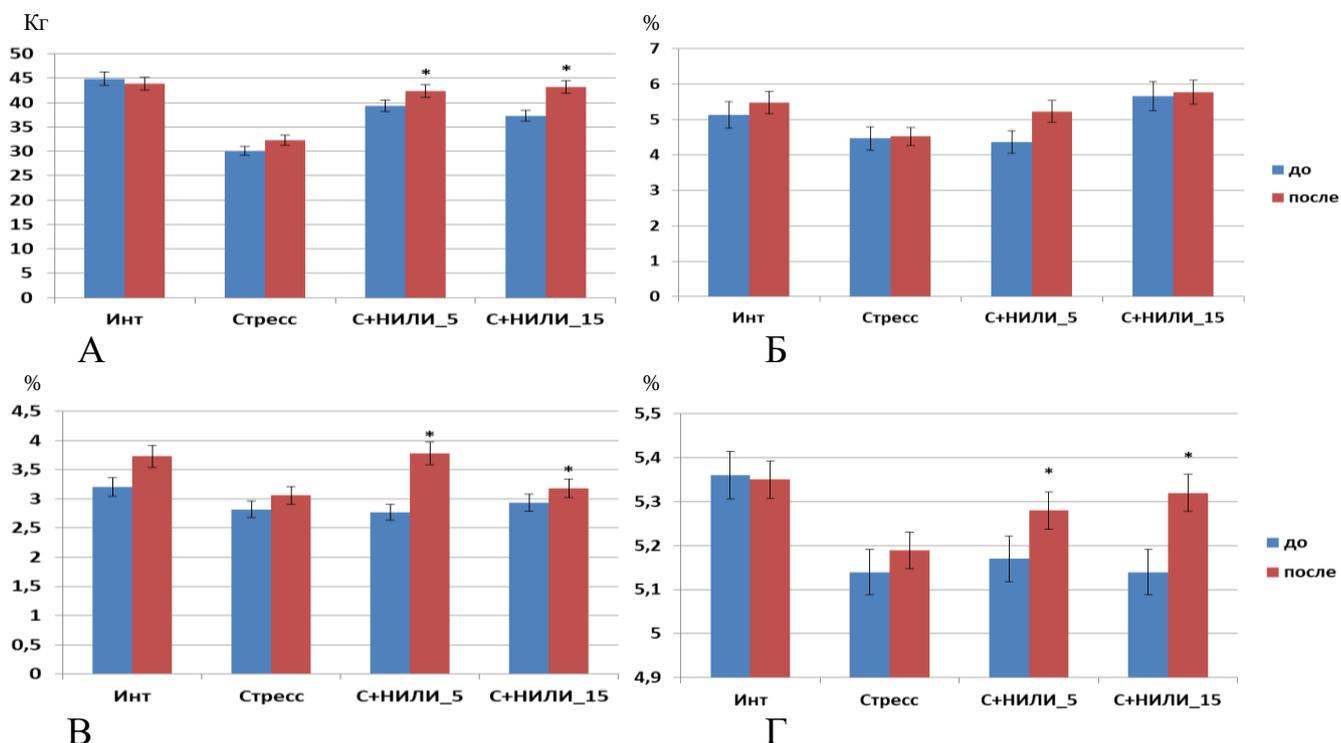


Рис. 8. Изменение молочной продуктивности и качества молока при стрессе и воздействии НИЛИ.

Примечание. А – молочная продуктивность, кг; Б – массовая доля жира, %; В – массовая доля белка, %; Г – массовая доля лактозы, %. С+НИЛИ_5 – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 5 минут, С+НИЛИ_15 – группа животных с технологическим стрессом и воздействием НИЛИ 15 минут. * – $p \leq 0,05$ по отношению к значениям до технологического стресса.

Таким образом, воздействие НИЛИ способствует мобилизации адаптационных возможностей организма, что связано с комплексным действием лазерного излучения на организм. Известно, что при стрессе в качестве начального этапа, дающего целый каскад процессов, выступает тканевая гипоксия, одной из причин которой может быть сосудистый спазм, вызванный активацией симпатической нервной системы и увеличением концентрации катехоламинов в крови. Выявленная в нашем исследовании нормализация морфологических и метаболических показателей эритроцитов приводит к улучшению реологии и микроциркуляции крови. В результате достигается оптимизация органной перфузии и увеличение количества доступного кислорода. Интенсификация кровообращения на уровне микроциркуляторного русла, увеличение зоны доставки кислорода активизирует аэробные метаболические процессы, реализует антигипоксический эффект НИЛИ. В результате уменьшается интенсивность

проявления самой стресс-реакции. Стресслимитирующий эффект НИЛИ тесно связан и с антиоксидантной способностью низкоинтенсивного лазерного излучения. На фоне более умеренной реакции уменьшается и гормональный ответ. По сути реализуется отрицательная обратная связь, которая обычно используется для поддержания внутренней стабильности биосистемы, что является классической концепцией гомеостаз. В кровь мобилизуется меньшее количество катехоламинов и глюкокортикоидов. Полученные результаты отражают реализацию нейроэндокринного эффекта действия НИЛИ. Известно, что при стрессовых нагрузках на фоне преобладающей секреции метаболитических гормонов в ущерб гонадотропным, складываются неблагоприятные условия для секреторной деятельности молочной железы. Угнетение выработки пролактина, отвечающего за процесс молокообразования, способствует снижению молочной продуктивности животных. Окситоцин обладает усиливающим действием по отношению к пролактину. При этом антагонистом окситоцина является адреналин. Антагонистическое действие адреналина препятствует полному проявлению стимулирующего действия пролактина на молокообразование. Кроме этого, адреналин вызывает сокращение капилляров, в том числе и в молочной железе. Вследствие этого нарушается непрерывное поступление молокообразующих компонентов, а также ферментов, необходимых для синтеза молока. Применение НИЛИ повышало показатели молочной продуктивности, вызывало увеличение относительной доли белка и лактозы в молоке крупного рогатого скота.

ВЫВОДЫ

1. При технологическом стрессе у коров регистрировалось увеличение морфологически измененных форм эритроцитов с увеличением фазового диаметра и фазовой высоты, рост концентрации МДА, 2,3 ДФГ и снижение ЭФПЭ, концентрации АТФ, активности Na^+/K^+ АТФ-аза относительно значений интактной группы в течение 1 суток – 7 суток после технологического стресса. Действие НИЛИ 830 нм 5 и 15 мин в течение 7 суток после технологического стресса вызывало рост ЭФПЭ на всем протяжении исследования, что сопровождалось восстановлением в течение 1 часа – 1 суток фазовых характеристик эритроцитов, концентрации МДА, АТФ, активности Na^+/K^+ АТФ-аза, антиоксидантной системы и в течение 7 суток концентрации 2,3 ДФГ до значений интактной группы.

2. Действие НИЛИ в экспериментах *in vitro* зависело от состояния клеток: НИЛИ на эритроциты коров после технологического стресса вызывало действие сопоставимое с влиянием *in vivo*, тогда как на эритроциты нестрессированных коров не оказывало значимого воздействия; на фоне кортизола при действии НИЛИ наблюдалось повышение адаптационных резервов клетки, тогда как при истощении эритроцитов в ходе инкубации с адреналином, действие НИЛИ было не эффективно и приводило к дальнейшему повреждению эритроцитов, что проявлялось в усилении окислительных процессов и истощении энергетических ресурсов эритроцитов. Глутаровая фиксация, блокада α - и β -

адренорецепторов уменьшала эффекты НИЛИ, что доказало возможность реализации НИЛИ через белки, адренорецепторы и сигнальные пути клеток.

3. Фазовая микроморфометрия эритроцитов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* позволила визуализировать модификацию клеток в режиме реального времени и провести количественную оценку состояния эритроцитов при стрессе и при действии НИЛИ: выявлена высокая корреляционная зависимость фазового диаметра от концентрации АТФ и 2,3 ДФГ, фазовой высоты от концентрации МДА в клетках.

4. Исследование гематологических, биохимических показателей крови, содержания кортизола в крови показало нивелирование действия технологического стресса у коров при использовании НИЛИ 830 нм 5 и 15 мин в течение 7 суток, что проявилось в более раннем восстановлении исследуемых показателей до значений интактной группы по сравнению с действием технологического стресса и в повышении молочной продуктивности через месяц после воздействия НИЛИ.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

С целью повышения продуктивности и резистентности крупного рогатого скота наряду с традиционными зооветеринарными приемами рекомендуется при технологическом стрессе коров применять низкоинтенсивное лазерное излучение с длиной волны 830 нм 5 или 15 минут в течение 7 дней в области уха животных.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертационных работ

1. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Самоделкин А.Г. Корягин А.С., Таламанова М.Н., **Белов А.А.** Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на показатели красной крови интактного и альтерированного организма // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2018. №3. С. 14-20.
2. Дерюгина А.В., Самоделкин А.Г., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Таламанова М.Н., **Белов А.А.** Оценка влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на морфологию эритроцитов при стрессе методом лазерной интерференционной микроскопии // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. №3 (1). С. 108-112.
3. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Кустова А.А., Таламанова М.Н., Акинчиц Е.К., **Белов А.А.** Роль структурных компонентов мембран эритроцитов в реализации действия низкоинтенсивного лазерного излучения при стрессе у крупного рогатого скота // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2019. №1. С. 73-78.
4. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Петров В.А., **Белов А.А.** Изменение формы эритроцитов крупного рогатого скота при технологическом стрессе // Естественные и технические науки. 2020. №6 (144). С. 86-88.
5. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Таламанова М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Применение низкоинтенсивного лазерного излучения для повышения молочной продуктивности коров // Международный вестник ветеринарии. 2020. №3. С. 139-144.
6. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения различных диапазонов на морфологию эритроцитов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2020. №8. С. 78-83.
7. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Метелин В.Б., Таламанова М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Морфофункциональные показатели эритроцитов крупного рогатого скота при стрессе и его

коррекции низкоинтенсивным лазерным излучением // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. 2021. №1. С. 67-71.

8. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Таламанова М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Структурная организация мембран эритроцитов при стрессе и коррекции низкоинтенсивным лазерным излучением // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2021. №1 (49). С. 3-7.

В изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных Scopus, WoS

9. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S., **Belov A.A.**, Talamanova M.N., Petrov V.A. Research of Erythrocytes Membranes Change by Laser Interference Microscopy // Opera Med et Physiologica. 2020. Vol. 7 (2). P.5-11.

10. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., **Белов А.А.**, Петров В.А. Диагностические возможности анализа эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т.66. №1. С. 22-25.

11. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., **Белов А.А.**, Игнатьев П.С., Метелин В.Б. Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки функционального состояния эритроцитов // Цитология. 2021. Т. 63. № 1. С. 74–79.

12. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., **Belov A.A.**, Ignatiev P. S., Metelin V.B. Assessing the Functional State of Red Blood Cells by Using the Laser Interference Microscopy // Cell and Tissue Biology, 2021, Vol. 15, №4, P. 388–392.

13. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Соловьева Т.И., Таламанова М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на биохимический статус и молочную продуктивность коров на фоне технологического стресса // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2021. Т. 13. №4. С. 193-208.

14. **Belov A.A.**, Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Petrov V.A. Solovyeva T.I., Martusevich A.K. Characteristic of the interaction of low-intensity laser radiation and erythrocytes // Archiv euromedica. 2021. Vol. 11. №.6. P. 29-32.

15. **Belov A.A.**, Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Petrov V.A. Morphological and functional properties of erythrocytes under stress and exposure to low-intensity laser radiation // Opera Med et Physiologica. 2021. Vol. 8 (4). P.13-18.

Авторские свидетельства, патенты, лицензии

16. Дерюгина А.А., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Таламанова М.Н., **Белов А.А.** Способ оценки стресс-реакции организма крупного рогатого скота. Патент на изобретение 2732759 С1, 22.09.2020. Заявка №2019141869 от 13.12.2019.

В материалах конференций, на которых были доложены и обсуждены основные материалы диссертационной работы

17. Deryugina A.V., Samodelkin A.G., Sidey C.R., Skvortsova G.A., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S., Talamanova M.N., **Belov A.A.** Molecular mechanisms of low intensity laser radiation influence on electrokinetic properties and activity Na⁺/K⁺-ATPase of cows erythrocytes in vitro experiments // Academic science – problems and achievements XV. North Charleston USA.2018, Vol. 3. P. 58-61.

18. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G., Ivashchenko M.N., **Belov A.A.** New possibilities of cell study with use of interference microscopy // Science discoveries and progress. Czech Republic, Karlovy Vary — Russia, Moscow, 28-29 April 2018. P. 57-60.

19. Дерюгина А.В., Самоделкин А.Г., Иващенко М.Н., **Белов А.А.** Laser interference microscopy used for the examination of cattle RBC resistance during the technological stress // X International congress. Biotechnology State of the art and perspectives. 815-816. mai. 2018, P. 38-40.

20. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Таламанова М.Н., **Белов А.А.** Влияние лазерного облучения низких интенсивностей на естественную резистентность телят в период физиологического иммунодефицита // Инновационные технологии в животноводстве: сборник статей Всероссийской научно-практической конференции — Пенза: РИО ПГАУ, 2018. С. 6-10.

21. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S., Talamanova M.N., **Belov A.A.** New opportunities to study the signs of stress in initiatory stages using the interference microscopy // 21 century: fundamental science and technology XVI. North Charleston, SC, USA. 2018. С. 71-73.

22. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Таламанова М.Н., **Belov A.A.** Сравнительный анализ воздействия различных режимов низкоинтенсивного лазерного излучения на метаболизм эритроцитов // В сборнике: наука сегодня: вызовы, перспективы и возможности. Материалы международной научно-практической конференции. Научный центр «Диспут». 2018. С. 53-54.
23. Самоделкин А.Г., Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Гушин В.А., Петров В.А., **Белов А.А.** Лазерная интерференционная микроскопия с целью выявления новых аспектов воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на функциональную морфологию клеток // В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы международного конгресса. 2019. С. 225-227.
24. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Таламанова М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Интерференционная микроскопия в оценке морфологических параметров эритроцитов с низким уровнем пуринаргических соединений // В сборнике: Окружающая среда и здоровье. Сборник статей Международной научно-практической конференции. Пенза. 2019. С. 34-37.
25. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Гушин В.А., Таламанова М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Морфологические показатели эритроцитов и топография их мембраны при воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения на фоне стресса // В сборнике: Инновационные технологии в зоотехнии и ветеринарии. Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции. Пенза. 2019. С. 41-44.
26. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на электрофоретическую подвижность эритроцитов крови крупного рогатого скота на фоне стресса // В сборнике: Инновационные технологии в зоотехнии и ветеринарии. Сборник статей II Всероссийской научно-практической конференции. 2020. С. 25-29.
27. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на содержание малонового диальдегида в сыворотке крови коров на фоне стресса // В сборнике: Инновационные технологии в зоотехнии и ветеринарии. Сборник статей II Всероссийской научно-практической конференции. 2020. С. 37-40.
28. **Белов А.А.**, Иващенко М.Н., Дерюгина А.В. Биохимические показатели крови высокопродуктивных коров при технологическом стрессе // В сборнике: Инициативы молодых - науке и производству. Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции для молодых ученых и студентов. Пенза, 2020. С. 17-20.
29. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Metelin V.B., **Belov A.A.**, Petrov V.A. Vital morphometry of rbc in their interaction with stress hormones // International forum "Biotehcnology State of the and perspectives" The proceedings of International forum «Biotehcnology: state of the art and perspectives» Moscow, october 23-25, 2020. P. 146-148.
30. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Таламанова М.Н., **Белов А.А.**, Петров В.А. Оценка клеточно-метаболических адаптивных реакций организма высокопродуктивных молочных коров при действии технологического стресса // в сборнике: Агропромышленный комплекс: состояние, проблемы, перспективы. сборник статей XV Международной научно-практической конференции. 2020. С. 64-67.
31. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., **Белов А.А.** Метаболические показатели крови коров в условиях индустриальной технологии // В сборнике: Государство. Бизнес. Общество. Цифровая среда: траектория взаимодействия от теории к практике. Сборник научных статей по итогам международной научно-практической конференции. Санкт-Петербург, 2021. С. 99-101.
32. **Белов А.А.**, Иващенко М.Н., Дерюгина А.В. Коррекция технологического стресса низкоинтенсивным лазерным излучением // Материалы Международной научно-практической конференции «Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК», посвященной 100-летию кафедры фармакологии и токсикологии СПбГУВМ – Санкт-Петербург, 2021. С. 24-26.
33. **Белов А.А.**, Дерюгина А.В., Иващенко М.Н. Изменения свойств эритроцитов при действии низкоинтенсивного лазерного излучения // Наука, технологии, кадры – основы достижений прорывных результатов в АПК: Сборник материалов Международной научно-практической конференции (26 – 27 мая 2021 г.). Выпуск XV в двух частях, ч. 1. / Под ред. Н.Л. Титова; С.Л. Алексеева; Н.М. Якушкина; В.Н. Фомина; Шилова В.Н. – Казань: ФГБОУ ДПО «Татарский институт переподготовки кадров агробизнеса», 2021. С. 270-278.
34. **Белов А.А.**, Дерюгина А.В., Иващенко М.Н. Белковый спектр мембран и внутриклеточный метаболизм эритроцитов крупно рогатого скота при технологическом стрессе и коррекции нарушений низкоинтенсивным лазерным излучением // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы конференции молодых ученых,

посвященной памяти проф. А.П. Веселова (Н. Новгород, 20–23 апреля 2021 г.). С. 24

35. Кустова А.А., Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., **Белов А.А.** Структурно-функциональное состояние эритроцитов при стрессе и воздействии лазерным излучением // В сборнике: Стресс и здоровье человека. Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Институт биологии и биомедицины. Нижний Новгород, 2021. С. 124-128.

36. Дерюгина А.В., **Белов А.А.**, Иващенко М.Н. Структурно-функциональные нарушения эритроцитов крупного рогатого скота и их коррекция низкоинтенсивным лазерным излучением при технологическом стрессе // в сборнике: XXVI Нижегородская сессия молодых ученых (технические, естественные науки). Материалы конференции. Нижний Новгород, 2021. С. 179-182

37. **Белов А.А.**, Дерюгина А.В., Иващенко М.Н. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на окислительные процессы в эритроцитах // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 75-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 19–22 апреля 2022 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского. 2022. С. 22.