



ДОСТИЖЕНИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ PROGRESS VETERINARY SCIENCE AND PRACTICES

УДК 619: 615.281 (349.6; 574)

DOI:10.31677/2072-6724-2021-32-2-60-72

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ВЕТЕРИНАРИИ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ (ЧАСТЬ 1)

^{1,2}Ю.С. Аликин, доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник

¹М.В. Алексева, младший научный сотрудник

¹В.В. Ермолаев, младший научный сотрудник

¹В.П. Клименко, научный сотрудник

¹Ю.В. Телегина, младший научный сотрудник

¹Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

²Новосибирский аграрный государственный университет

E-mail: alikiny@mail.ru

Ключевые слова: биологически активные вещества, ферменты нуклеинового обмена, обладающие противовирусным действием.

Реферат. Нуклеазы клеток и сыворотки крови рассматриваются как естественный биологический барьер, одно из первых звеньев в противовирусной защите организма: нуклеазы действуют на вирусы, которым обычный иммунологический барьер не может противостоять. Инактивация ферментативных свойств нуклеаз приводит также к потере их противовирусной активности. Установлено, что нуклеазы не инактивируют нативный вирус вне клетки и действуют в основном на вирус, размножающийся в клетках. Наблюдается прямая зависимость противовирусной активности эндонуклеазы от концентрации фермента в среде. Первый созданный на основе эндонуклеазы *Serratia marcescens* противовирусный препарат получил название эндонуклеаза бактериальная. Технология его была разработана совместными исследованиями НИКТИ БАВ Минмедпрома (г. Бердск, Новосибирской области) и ИЦиГ СО АН СССР в 1973–1984 гг. Эндонуклеаза *Serratia marcescens* способна расщеплять нуклеиновые кислоты как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов. Фермент тормозит размножение соответственно вирусов везикулярного стоматита и осповакцины в культуре клеток куриных фибробластов. Это был первый противовирусный препарат в истории пчеловодства, предназначенный для профилактики острого и хронического паралича и других вирусных заболеваний пчел. Препарат предполагался также в качестве противовирусного средства для широкого спектра заболеваний у различных организмов. Была изучена эффективность бактериальной эндонуклеазы в качестве средства профилактики и лечения респираторных вирусных заболеваний телят. Исследования проводили на промышленном комплексе по выращиванию нетелей совхоза «Госненский» Ленинградской области на телятах черно-пестрой породы 20–60-дневного возраста. Для опытов использовали бактериальную эндонуклеазу производства Вышневолоцкого завода ферментных препаратов или НИКТИ БАВ Минмедпрома. В дальнейшем в НИКТИ БАВ совместно с ООО «Диафарм» на основе эн-

донуклеаза бактериальной разработан противовирусный препарат второго поколения – эндоглюкин. Производственные опыты по изучению его действия в качестве лечебно-профилактического средства при респираторных болезнях телят были проведены в течение 2007–2011 гг. в СХПК «Причудымский» Ачинского района Красноярского края при участии кафедры эпизоотологии и паразитологии факультета ветеринарной медицины КрасГАУ и в ЗАО «Суздальское» Доволенского района Новосибирской области. Профилактическое применение эндоглюкина при бронхопневмонии телят позволяет снизить заболеваемость от 2,2 до 3,1 раза. Препарат эндоглюкин в сочетании с лекарственными средствами, показанными для терапии легочной патологии, обладает лечебной эффективностью при бронхопневмониях телят.

THE RESULTS OF THE USE OF BIOTECHNOLOGICAL DRUGS IN VETERINARY MEDICINE, PROMISING FOR MEDICINE (PART 1)

^{1,2}**Yu.S. Alikin**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Senior Research Fellow

¹**M.V. Alekseeva**, Junior Research Fellow

¹**V.V. Ermolaev**, Junior Research Fellow

¹**V.P. Klimenko**, Research Fellow

¹**Yu.V. Telegina**, Junior Researcher

¹*Institute of Medical Biotechnology FSBU SSC VB «Vector»*

²*Novosibirsk Agrarian State University*

Key words: biologically active substances, nucleic metabolism enzymes with antiviral effect

Abstract. Cell and serum nucleases are considered as a natural biological barrier, one of the first links in the body's antiviral defense: nucleases act on viruses that the usual immunological barrier cannot resist. Inactivation of the enzymatic properties of nucleases also leads to the loss of their antiviral activity. It was found that the nucleases do not inactivate the native virus outside the cell and act mainly on the virus that multiplies in the cells. There is a direct dependence of the antiviral activity of endonuclease on the concentration of the enzyme in the medium. The first antiviral drug created on the basis of the Serratia marcescens endonuclease was called bacterial endonuclease. Its technology was developed by joint research of NIKTI BAS of the Ministry of Medical Industry (Berdsk, Novosibirsk region) and ICIG SB of the USSR Academy of Sciences in 1973–1984. Serratia marcescens endonuclease is capable of cleaving the nucleic acids of both RNA and DNA-containing viruses. The enzyme inhibits the reproduction of vesicular stomatitis and smallpox vaccine viruses in chicken fibroblast cell culture, respectively. It was the first antiviral drug in the history of beekeeping, designed to prevent acute and chronic paralysis and other viral diseases of bees. The drug was also intended as an antiviral agent for a wide range of diseases in various organisms. The effectiveness of bacterial endonuclease as a means of prevention and treatment of respiratory viral diseases in calves was studied. The research was carried out at the industrial complex for growing heifers of the Gosnensky state farm in the Leningrad region on calves of a black-and-white breed of 20–60 days old. For the experiments, we used bacterial endonuclease produced by the Vyshnevolotsky Plant of Enzyme Preparations or NICTI BAS of the Ministry of Medical Industry. In the future, NIKTI BAV together with Diafarm LLC developed a second – generation antiviral drug, endoglucin, based on bacterial endonucleosis. Production experiments to study its effect as a therapeutic and prophylactic agent for respiratory diseases of calves were conducted during 2007–2011. in the agricultural complex «Prichulymsky» of the Achinsky district of the Krasnoyarsk Territory with the participation of the Department of Epizootology and Parasitology of the Faculty of Veterinary Medicine of KrasGAU and in CJSC «Suздalskoye» of the Dovolensky district of the Novosibirsk region. Prophylactic use of endoglucin in calves with bronchopneumonia can reduce the incidence from 2.2 to 3.1 times. The drug endoglucin in combination with drugs indicated for the treatment of pulmonary pathology, has therapeutic effectiveness in bronchopneumonia of calves.

История применения ферментных препаратов в биологии, в медицине и в АПК связана с именами ряда ученых и энтузиастов-практиков: акад. Д.Г. Кнорре, чл.-корр. Р.И. Салганика, акад. А.А. Баева, его сына А.А. Баева, д-ра хим. наук С.Н. Загребельного, канд. мед. наук А.М. Гончара, канд. мед. наук Н.Л. Галахарь, канд. биол. наук А.А. Трухачева, д-ра биол. наук В.И. Масычевой, канд. биол. наук В.Ф. Подгорного, канд. биол. наук В.К. Старостиной, канд. биол. наук Н.М. Пустошиловой, Л.П. Сенженко, С.Ф. Грачевой, В.И. Пупковой в Новосибирском академгородке; проф., д-ра ветер. наук Б.С. Семенова в Ленинградском ветеринарном институте Госагропрома СССР (кафедра хирургии) и многих других, чей вклад в развитие этой области знаний и биотехнологии значителен и бесценен. Эти исследования были выполнены в Институте цитологии и генетики (ИЦиГ) СО АН СССР, в Институте химической биологии и экспериментальной медицины (ИХБиЭМ) СО АН СССР, Научно-исследовательском конструкторско-технологическом институте биологически активных веществ (НИКТИ БАВ) Микробиопроба СССР (в Новосибирске), в Дальневосточном зональном научно-исследовательском ветеринарном институте Минсельхоза СССР (г. Благовещенск) д-ром ветер. наук В.И. Полтевым, канд. биол. наук П.Л. Талпалацким.

Основная стратегия защиты организма различных классов от вирусов строится на кратковременных и длительных механизмах резистентности. Как известно, у млекопитающих, птиц, рыб кратковременные механизмы обеспечиваются неспецифическими реакциями иммунитета, а долговременные – специфическими. Все эти процессы являются производными эволюции макро- и микроорганизмов на Земле, в том числе у пчел.

Как известно исторически, эти процессы противoinфекционной устойчивости макроорганизма были обозначены как В-гуморальные, Т-клеточные иммунные реакции, фагоцитоз и другие составляющие этой системы.

В соответствии с принципами и механизмами, выясненными на данный момент, строится и стратегия современной защиты организма от вирусов. Неспецифический иммунитет обеспечивается в организме за счет применения стимуляторов неспецифической резистентности: цитокинов (белков, например, интерферонов, способных вызывать устойчивость к различным вирусам), лимфокинов (белков, обеспечивающих взаимодействие между клетками иммунной системы), индукторов интерферона и др., а специфический иммунитет – вакцинами и антителами. У млекопитающих, птиц и рыб стимуляторы неспецифической резистентности играют чрезвычайно важную роль в формировании противoinфекционной устойчивости. В то же время необходимо отметить, что иммунитет у пчел, по-видимому, целиком основан на неспецифических реакциях.

Ферменты обмена нуклеиновых кислот (НК) играют важную роль как в процессах реализации потенциала генотипа, так и в научных исследованиях в области молекулярной биологии, генетической инженерии и биотехнологии. Но изучение механизма действия нуклеаз привлекательно с позиций выяснения их роли в качестве эффекторных молекул противовирусной защиты клеток. Одним из наиболее изученных энзимов этого класса является секретируемая эндонуклеаза *Serratia marcescens*.

В основе предположений о возможном противовирусном действии нуклеаз – ферментов, разрушающих НК, лежат следующие факты и соображения. Общеизвестно, что эффекторный (рабочий) механизм системы интерферона у позвоночных, направленный на элиминацию вирусной инфекции, основан на активации собственных эндонуклеаз в клетке. Именно с помощью нуклеаз организм и его клетки защищаются от вирусов. Хотя механизм противовирусных эффектов нуклеаз неоднократно обсуждался, он постоянно дискутируется. Поэтому представляется необходимым снова обратиться к его основным положениям [1–4].

1. Нуклеазы представляют собой ферменты, которые катализируют расщепление фосфорно-диэфирных связей между нуклеотидами (основными «кирпичиками») в молекулах нукле-

иновых кислот. Рибонуклеаза (РНК-аза) расщепляет молекулы РНК, дезоксирибонуклеаза (ДНК-аза) – молекулы ДНК. Существуют эндонуклеазы, расщепляющие и РНК, и ДНК. Для действия большинства нуклеаз последовательность нуклеотидов в полинуклеотиде не имеет значения.

2. Расщепление РНК и ДНК нуклеазами на фрагменты разрушает целостность информации, которую несут эти полинуклеотиды. После этого фрагменты полинуклеотидов уже не кодируют синтез новых молекул вирусных нуклеиновых кислот и вирусных белков.

3. Из первых двух положений следует, что РНК-аза должна расщеплять РНК любого РНК-содержащего вируса, а ДНК-аза – ДНК любого ДНК-содержащего вируса. Эндонуклеазы могут разрушать РНК и ДНК любых вирусов. В результате действия нуклеаз вирусные РНК и ДНК должны терять способность служить матрицами для синтеза вирусных нуклеиновых кислот и белков. Следовательно, нуклеазы могут таким образом прерывать размножение вирусов.

4. Вирусные нуклеиновые кислоты в составе вирионов одеты белково-липидными оболочками (чехлами), которые защищают их от действия повреждающих внешних факторов и в том числе от нуклеаз. Целые вирусные частицы нечувствительны к действию нуклеаз.

5. Когда вирус проникает в клетку, он сбрасывает защитный белковый чехол, и вирусная нуклеиновая кислота может стать на этот период доступной повреждающему действию нуклеазы. Действительно, в этот период введенные извне нуклеазы гидролизуют вирусные нуклеиновые кислоты. Расщепление вирусных нуклеиновых кислот препятствует размножению вирусов.

6. Если введенные извне нуклеазы, проникнув в зараженную клетку, разрушат молекулы вирусных нуклеиновых кислот, то не могут ли они при этом расщепить и собственные клеточные РНК и ДНК? Естественно, что нуклеазы не различают фосфодиэфирные связи вирусных и клеточных нуклеиновых кислот. В этом случае нуклеазы будут повреждать не только вирус, но и клетку. Но, как показывает практика, этого не происходит.

7. Клеточные РНК и ДНК могут не повреждаться попадающими извне нуклеазами, если эти ферменты, как и все большие молекулы, проникают в клетку путем пиноцитоза, захвата их клеточными мембранами и заключения в пиноцитозную вакуоль (фаголизосому). В этом случае нуклеазы будут изолированы внутри клетки. Известно, что именно этот путь является основным или даже единственным способом попадания больших молекул в клетку из межклеточной среды.

8. Поскольку вирус попадает в клетку также путем активного захвата (через рецепторы), то если вирус и нуклеаза оказываются одновременно в межклеточном пространстве, они могут быть вместе захвачены клеткой. В этом случае внутри пиноцитозных вакуолей будет происходить их взаимодействие: атака нуклеазой вирусной нуклеиновой кислоты, освобождающейся от белкового чехла. В этом случае нуклеазы будут расщеплять вирусные нуклеиновые кислоты, тормозить их репликацию и размножение вирусов, не повреждая существенно клеточные нуклеиновые кислоты и не нарушая жизнь клетки.

9. Заражение клеток внутри клеточной популяции происходит не только за счет межклеточного распространения вновь возникших вирионов, но и за счет распространения инфекционных молекул вирусных нуклеиновых кислот. Повышение концентрации нуклеаз в межклеточном пространстве будет блокировать этот путь заражения клеток.

10. Нуклеазы клеток и сыворотки крови рассматриваются как естественный биологический барьер, одно из первых звеньев в противовирусной защите организма: нуклеазы действуют на вирусные кислоты, которым обычный иммунологический барьер не может противостоять.

К списку нуклеаз, проявляющих противовирусные свойства на моделях *in vitro*, относятся панкреатические РНК-азы, ДНК-азы, а также эндонуклеазу *Serratia marcescens* [4, 5]. Установлено, что рибонуклеазы обладают выраженной противовирусной активностью в от-

ношении таких РНК-содержащих вирусов, как вирусы гриппа, полиомиелита, клещевого энцефалита. Дезоксирибонуклеазы тормозят синтез и размножение ДНК-содержащих вирусов, осповакцины, аденовируса, герпеса. Эндонуклеаза *Serratia marcescens* способна расщеплять НК как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов. Фермент тормозит размножение соответственно вирусов везикулярного стоматита и осповакцины в культуре клеток куриных фибробластов. Инактивация ферментативных свойств нуклеаз приводит также к потере их противовирусной активности. Установлено, что нуклеазы не инактивируют нативный вирус вне клетки и действуют в основном на вирус, размножающийся в клетках. Наблюдается прямая зависимость противовирусной активности эндонуклеазы от концентрации фермента в среде.

Клиническое применение ферментов показало высокую эффективность ДНК-азы при заболеваниях человека, вызываемых вирусом герпеса и аденовирусами, а РНК-азы – при клещевом энцефалите у людей и легочных патологиях [6–8].

Изучение токсичности (переносимости) эндонуклеазы бактериальной на лабораторных животных. Работа выполнена в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР (г. Новосибирск) и Ленинградском ветеринарном институте Госагропрома СССР. В соответствии с программой было проведено исследование токсичности бактериальной эндонуклеазы в условиях применения препарата (аэрозольно) на лабораторных животных – беспородных мышах. До этого препарат активно исследовался и был успешно применен в пчеловодстве для профилактики вирусного паралича пчел [9, 10].

В работе использовался препарат бактериальной эндонуклеазы серии 15 С–2 от 4 мая 1982 г. Активность препарата – 15276,4 ЕА/мг, содержание белка – 6,7 %, аммиака – 1,1 %, удельная активность – 228006 ЕА/мг белка.

Условия производственного применения препарата: аэрозольное введение препарата с помощью аэрозольного генератора в дозе 880 тыс. ЕА в 1 м³. Эндонуклеаза находилась в растворе следующего состава (на 1 м³): хлористый аммоний – 1–1,5 г, глицерин – 40–50 г; 0,5 %-й раствор новокаина – 60 мл; дистиллированная вода – 200–220 мл + эндонуклеаза. В смесь добавлен хлористый магний до 0,01 М.

В лабораторных условиях смесь распыляли в течение 30 мин. Животных выдерживали в камерах 1 ч после полного распыления препарата. Контрольным животным аэрозольно вводили раствор указанного состава, но без препарата (1-я группа).

В работе исследовались следующие дозы эндонуклеазы: терапевтическая – 800 000 ЕА/м³ (2-я группа), 20-кратная – 1,6·10⁷ ЕА/м³ (3-я группа), 400-кратная – 3,2·10⁸ ЕА/м³ (4-я группа), 2000-кратная – 1,6·10⁹ ЕА/м³ (5-я группа).

Таблица 1

Температура тела у мышей опытных и контрольной групп при аэрозольном введении различных доз эндонуклеазы бактериальной

Группа	Кол-во мышей (n)	Температура тела, °С				
		0	1 ч	1 сут	5 сут	7 сут
1-я	18	37,50±0,90 (n=18)	35,10±1,29 (n=18)	37,80±1,00 (n=18)	38,20±0,49 (n=11)	38,20±0,00 (n=4)
2-я	21	38,10±0,61 (n=21)	37,60±0,74 (n=21)	38,40±0,31 (n=21)	38,30±0,47 (n=14)	37,90±0,98 (n=7)
3-я	21	38,40±0,45 (n=21)	36,70±0,56 (n=21)	38,00±0,51 (n=21)	38,60±0,32 (n=14)	38,50±0,46 (n=7)
4-я	21	38,20±0,3 (n=21)	37,00±0,61 (n=21)	37,50±0,49 (n=21)	38,80±0,41 (n=14)	38,50±0,54 (n=7)
5-я	7	38,20±0,33 (n=7)	37,70±0,93 (n=7)	38,60±0,46 (n=7)	-	-

Таблица 2

Масса тела у мышей опытных и контрольной групп при аэрозольном введении различных доз эндонуклеазы бактериальной

Группа	Кол-во мышей (n)	Масса тела, г				
		0	1 ч	1 сут	5 сут	7 сут
1-я	18	24,46±2,46 (n=18)	24,11±2,46 (n=18)	25,20±3,07 (n=18)	26,10±2,55 (n=11)	27,30±1,95 (n=4)
2-я	21	26,19±2,58 (n=21)	25,12±2,49 (n=21)	26,53±2,80 (n=21)	27,57±3,57 (n=14)	25,19±2,93 (n=7)
3-я	21	16,55±2,76 (n=21)	16,09±2,57 (n=21)	17,44±2,56 (n=21)	19,08±2,88 (n=14)	18,94±3,27 (n=7)
4-я	21	16,29±2,57 (n=21)	16,21±2,42 (n=21)	17,38±2,54 (n=21)	19,60±2,62 (n=14)	20,91±3,62 (n=7)
5-я	7	18,81±4,24 (n=7)	18,26±4,10 (n=7)	18,73±4,29 (n=7)	-	-

Таблица 3

Частота дыхания у мышей опытных и контрольной групп при аэрозольном введении различных доз эндонуклеазы бактериальной

Группа	Кол-во мышей (n)	Частота дыхания в минуту				
		0	1 ч	1 сут	5 сут	7 сут
1-я	18	177,00±21,50 (n=18)	193,00±13,80 (n=18)	207,00±13,60 (n=18)	204,00±14,80 (n=11)	200,00±16,10 (n=4)
2-я	21	186,00±11,40 (n=21)	198,00±14,80 (n=21)	205,00±13,60 (n=21)	203,00±18,30 (n=14)	215,00±15,30 (n=7)
3-я	21	179,00±10,95 (n=21)	182,00±12,90 (n=21)	198,00±11,40 (n=21)	220,00±19,20 (n=14)	222,00±21,50 (n=7)
4-я	21	185,00±11,60 (n=21)	210,00±22,20 (n=21)	212,00±21,50 (n=21)	208,00±26,50 (n=14)	225,00±31,50 (n=7)
5-я	7	210,00±16,30 (n=7)	217,00±20,20 (n=7)	213,00±17,30 (n=7)	-	-

Состояние животных всех пяти групп (четыре опытных и одна контрольная) оценивали по следующим параметрам: температура тела, частота дыхания, масса тела, формула крови и патоморфологические исследования легких. Первое измерение указанных параметров производили до обработки мышей; второе – через 1 ч после окончания аэрозольной обработки; третье – через 24 ч; четвертое – через 120 ч; пятое – через 168. Результаты представлены в табл. 1–3.

Из таблиц видно, что статистически достоверных изменений температуры тела, массы тела, частоты дыхания не наблюдалось в течение всего периода наблюдения.

При исследовании крови отмечали некоторый лимфоцитоз, иногда увеличение количества эозинофилов на 7-е сутки, снижение нейтрофилов. Однако это было закономерно как для мышей опытных, так и контрольной (без введения эндонуклеазы) групп. Результаты патоморфологических исследований показали, что ингаляция растворов эндонуклеазы не вызывает реактивных и воспалительных изменений в бронхах и легочной ткани. Сколько-либо характерных различий в поведении животных контрольной и всех опытных групп не отмечено.

Увеличение дозы препарата от 800 тыс. ЕА/м³ (2-я группа) до 1,6·10⁹ ЕА/м³ (5-я группа) не продемонстрировало токсического или любого другого патологического эффекта. Увеличение терапевтической дозы в 2000 раз не приводило к летальному эффекту.

Производственные опыты *in vivo* на телятах. Была изучена эффективность бактериальной эндонуклеазы в качестве средства профилактики и лечения респираторных вирусных заболеваний телят.

Исследования проводили на промышленном комплексе по выращиванию нетелей совхоза «Госненский» Ленинградской области на телятах черно-пестрой породы 20–60-дневного возраста в 1984–1990 гг. Для опытов использовали бактериальную эндонуклеазу производства Вышневолоцкого завода ферментных препаратов или НИКТИ БАВ Минмедпрома с удельной активностью 12–14 тыс. ЕА/мг.

Препарат эндонуклеазы вводили телятам интратрахеально в 10 мл растворителя с помощью шприца с толстой иглой, которой прокалывали снаружи трахею и орошали таким образом слизистую дыхательных путей. В качестве растворителя применяли 0,005 М раствор хлористого магния в дистиллированной воде (ионы магния являются активаторами эндонуклеазы).

Для определения безвредных доз эндонуклеазы исследовали влияние препарата на общее состояние, температуру тела, поведенческие реакции телят. Препарат испытывали в дозах (на 10 мл) : 100000 ЕА – на 20 телятах, 50000 ЕА – на 20 телятах, 25000 ЕА – на 40 телятах, 16700 ЕА – на 100 телятах, 12500 ЕА – на 20 телятах, 5000 ЕА – на 20 телятах и 2000 ЕА – на 20 телятах. Способность эндонуклеазы предупреждать респираторные заболевания исследовали, используя избранную наименьшую эффективную и безвредную дозу фермента 2000 ЕА/10 мл, на 310 телятах.

Интратрахеальное введение эндонуклеазы бактериальной телятам. Введение телятам бактериальной эндонуклеазы интратрахеально в дозах от 16700 до 100000 ЕА (в 10 мл 0,005 М магния хлористого) вызывало выраженные изменения общего состояния телят: одышка, мышечная дрожь, угнетение двигательной активности, повышение температуры тела. Следует заметить, что такие реакции на введение препарата проходили у животных в течение 1,5–10 ч. При введении эндонуклеазы в дозе 12500 ЕА у телят отмечалось незначительное угнетение общего состояния, выделение слизи из носа, легкая мышечная дрожь у нескольких животных. Эти явления проходили в течение 1 ч.

Введение эндонуклеазы в дозе 5000 ЕА (в 10 мл растворителя) интратрахеально не сопровождалось существенными изменениями в общем состоянии животных, у нескольких животных наблюдалось некоторое ограничение подвижности, слабое слезотечение, понурая поза.

Таким образом, наши наблюдения показали, что безвредные дозы эндонуклеазы составляют 2500 – 5000 ЕА в 10 мл 0,005 М магния хлористого на одно интратрахеальное введение телятам в возрасте 20–60 дней.

Профилактическое действие эндонуклеазы исследовали на 310 телятах. Из них 170 получали эндонуклеазу интратрахеально один раз в день в дозе 2000 ЕА в 10 мл 0,005 М магния хлористого и 140 телят такую же дозу дважды с интервалом в 10 дней.

После введения этой дозы препарата общее состояние животных не изменилось: температура тела, пульс, частота дыхания оставались в пределах нормы.

Животные контрольной группы (250 телят) эндонуклеазу не получали. Телят, получавших эндонуклеазу, и телят контрольной группы наблюдали в течение 2 месяцев. В течение этого срока из 310 телят, получавших эндонуклеазу, респираторные заболевания возникли у 51 животного (16 %). Заболевание у этих животных протекало в относительно легкой форме и после обычного лечения все животные выздоровели. В контрольной группе переболело бронхопневмонией 175 телят из 210 (70 %). Из них у 17 телят заболевание протекало в тяжелой форме, они были выбракованы и отправлены на мясокомбинат (табл. 4).

Проведенные исследования позволили выбрать дозу бактериальной эндонуклеазы для интратрахеального введения, обеспечивающую у телят значительное снижение частоты респираторных заболеваний и не вызывающую побочных реакций.

Частота дыхания у мышей опытных и контрольной групп при аэрозольном введении различных доз эндонуклеазы бактериальной

Группа	Количество телят, гол	Переболело телят		Из них выбраковано	
		гол.	%	гол.	%
Получавшая эндонуклеазу	310	51	16	-	-
Контрольная	250	175	70	17	6

Однократное внутритрахеальное введение 20–60-дневным телятам 2000 ЕА эндонуклеазы в 10 мл 0,005 М магния хлористого снижает частоту респираторных заболеваний у телят более чем в 4 раза, уменьшает тяжесть заболеваний, что исключает вынужденный убой.

Экономический эффект от применения бактериальной эндонуклеазы в расчете на одного теленка составил 76 руб. (за вычетом стоимости препарата). Применение препарата для профилактики заболеваний одной только группы телят в 310 животных принесло хозяйству доход в сумме 23607 руб. в сопоставимых ценах 1984–1990 гг.

Профилактические противовирусные эффекты эндонуклеазы наблюдали у телят в опытах по защите их от ОРЗ на промышленных животноводческих комплексах. Эти заболевания органов дыхания телят вызываются главным образом РНК- и ДНК-вирусами различных семейств: инфекционного ринотрахеита (герпес-), парагрипп-3 (ортомиксо-), аденовирусы I и II (адено-), вирус диареи (рота-), респираторный синтициальный вирус (парамиксо-), парвовирусами. Поэтому оправданно применение эндонуклеазы, неспецифически расщепляющей РНК и ДНК вирусов. Как показали наблюдения, аэрозольное применение эндонуклеазы в 4 раза снижает частоту респираторных заболеваний у телят и ослабляет их тяжесть.

В связи с тем, что в условиях промышленного животноводства предпочтение отдается менее трудоемким методам профилактики заболеваний животных, было проверено действие бактериальной эндонуклеазы при однократном интраназальном введении в несколько больших дозах. Это было обусловлено тем, что со слизистой носа происходит частичное смывание фермента. Некоторые животные после введения препарата облизывают ноздри кончиком языка, смывая препарат.

Бактериальная эндонуклеаза в дозе 4 тыс. ЕА интраназально была введена 260 телятам дважды с интервалом в 10 дней. В контрольной группе было 147 животных.

После интраназального применения препарата в дозе 4 тыс. ЕА у 5 % животных отмечена мышечная дрожь, слезотечение, угнетенность общего состояния. Из носовой полости у таких телят обильно текла катаральная жидкость. Отмеченные признаки наблюдались в течение 5–6 ч после введения эндонуклеазы и постепенно исчезали. Через 24 ч после обработки телят препаратом клиническое состояние этих животных было таким же, как у контрольных.

Введение бактериальной эндонуклеазы в дозе 3 тыс. ЕА интраназально (154 животных) и интратрахеально (56 животных), не сопровождалось изменениями в общем состоянии телят. Только у отдельных животных отмечалось учащение и обильное истечение катаральной жидкости из ноздрей. При выборочной термометрии температура тела у них была в пределах 38,9–39,2 °С. Через 6 ч отмеченные явления исчезали. В контрольной группе (161 животное) подобных явлений не отмечено. Эти данные подтвердили целесообразность введения эндонуклеазы телятам в дозе, не превышающей 1 тыс. ЕА на теленка дважды с интервалом в 7–10 дней.

Увеличение дозы в 4 раза не приводит к усилению профилактического эффекта. Хотя такое увеличение дозы бактериальной эндонуклеазы не опасно для здоровья и жизни животных, но у отдельных животных при этом наблюдается легкая анафилактическая реакция (мышечная

дрожь, одышка, слезотечение и др.), исчезающая без лечебного вмешательства. По этим причинам увеличивать дозу выше 1 тыс. ЕА представляется нецелесообразным.

Изучение эффективности специфического действия эндоглиукина при интраназальном введении телятам против вирусных респираторных болезней. Первый созданный на основе эндонуклеазы *Serratia marcescens* противовирусный препарат получил название эндонуклеаза бактериальная. Технология его была разработана совместными исследованиями НИКТИ БАВ и ИЦиГ СО АН СССР [9]. Для пчеловодства эндонуклеаза бактериальная была разработана в 1973–1984 гг. в НИКТИ биологически активных веществ (г. Бердск Новосибирской области). Это был первый противовирусный препарат в истории пчеловодства, предназначенный для профилактики острого и хронического паралича и других вирусных заболеваний пчел [9, 10]. В дальнейшем в ООО «Диафарм» на основе эндонуклеазы бактериальной разработан противовирусный препарат второго поколения – эндоглиукин [11–13].

Эндоглиукин, обладающий более выраженным противовирусным действием по сравнению с эндонуклеазой бактериальной, также привлекателен с целью изучения возможности его использования для профилактики и лечения респираторных болезней телят (бронхопневмонии).

Производственные опыты по изучению его действия в качестве лечебно-профилактического средства при респираторных болезнях телят были проведены в течение 2007–2011 гг. в СХПК «Причулымский», Ачинского района Красноярского края при участии кафедры эпизоотологии и паразитологии факультета ветеринарной медицины КрасГАУ (профессор, доктор ветеринарных наук В.В. Палунина) и в ЗАО «Суздальское» Доволенского района Новосибирской области (доктор биологических наук Ю.С. Аликин).

Методы обработки. Исследования проводили на молочных фермах на телятах черно-пестрой породы 20–60-дневного возраста. Для опытов использовали эндоглиукин производства ООО «Диафарм». Препарат применяли в форме аэрозоля интраназально. Рабочий раствор препарата готовили перед обработкой и хранили в холодильнике не более суток.

Эндоглиукин в количестве 50000 ЕА (содержимое одного флакона) растворяют в 500 мл кипяченой воды при комнатной температуре и в этот раствор добавляют 0,62 г магния сернокислого (активатор фермента). Эндоглиукин в количестве 10000 ЕА (содержимое одного флакона) растворяют в 100 мл кипяченой и охлажденной воды при комнатной температуре и в этот раствор добавляют 0,12 г магния сернокислого (активатор фермента).

Для получения аэрозоля применяли аппарат Шилова, позволяющий дозировать приготовленный раствор. Раствор препарата вводят телятам по 5 мл в каждую ноздрю в носовые ходы в виде мелкокапельной струи (суммарная доза для одного теленка составляет 1 000 ЕА). Приготовленным раствором с суммарной активностью 10 000 ЕА обрабатывают однократно не менее 10 телят, а с активностью 50 000 единиц активности не менее 50 телят однократно. С профилактической целью телят 0,5–2 месячного возраста обрабатывают дважды через 7–10 дней. С лечебной целью телят обрабатывают эндоглиукином интраназально 2–3 раза с интервалом в 2 дня в тех же дозах.

Диагноз на бронхопневмонию ставили на основании клинических наблюдений, лабораторных и патолого-анатомических исследований. Наблюдение за состоянием телят в опытных и контрольных группах проводили в течение одного месяца после профилактического или лечебного применения эндоглиукина.

Препарат был испытан в качестве лечебно-профилактического средства при бронхопневмониях телят в 2007–2010 гг. в СХПК «Причулымский» Ачинского района Красноярского края под руководством профессор КрасГАУ В.В. Палуниной и гл. ветврача хозяйства М.В. Билокур. Контрольные группы животных были обработаны аэрозольно йодистым алюминием. Результаты испытаний представлены в табл. 5.

Таблица 5

Результаты испытаний профилактического действия препарата эндоглиюкин при респираторных заболеваниях молодняка крупного рогатого скота

Год	Возраст, мес	Количество обработанных животных, гол.		Кол-во заболевших бронхопневмонией, гол/%		Кол-во выздоровевших животных, гол/%		Кол-во вынужденно убитых животных, гол/%	
		опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
2007	0,5-2	93	91	12/12,9	31/34,1	н/и	н/и	-	2/2,2
	1-2	22	22	н/и	н/и	22/100	19/86,4	-	3/13,6
2008	1-2	15	15	н/и	н/и	14/93,3	12/80,0	-	2/13,3
	0,7-2	75	75	н/и	н/и	9/10,7	25/33,3	-	1/1,3
2010	0,5-2	103	98	14/13,6	29/29,6	н/и	н/и	-	3/3,1
	1-2	20	20	н/и	н/и	20/100	19/85	1/5,0	3/15
2011	1-2	31	31	н/и	2	н/и	н/и	-	2

Примечание. н/и – не исследовали

Изучение профилактического действия эндоглиюкина. В первой серии опытов эндоглиюкин в дозе 1 тыс. ЕА вводили 15–60-дневным телятам на 2–3-й день после перевода их в секцию, т.е. на 7–10-й день после завоза животных для комплектования секций. Повторную обработку проводили на 10-й день после первого введения препарата. В этом опыте группа телят (опытная), обработанная эндоглиюкином, включала 93 головы, а контрольная, обработанная аэрозольно йодистым алюминием, – 91. Количество телят, заболевших бронхопневмонией в опытной группе, составило 12 голов (12,9%), в контрольной – 31 (34,1%). Применение эндоглиюкина позволило более чем в 2,6 раза снизить заболеваемость бронхопневмониями. В контрольной группе было вынуждено убито 2 теленка (2,2%). Среднесуточный прирост у телят опытной группы составил 592,1 г, а в контрольной – только 503,3 г.

Во второй серии опытов эндоглиюкин в дозе 1 тыс. ЕА вводили 15–60-дневным телятам по той же схеме. В этом опыте группа телят (опытная), обработанная эндоглиюкином, включала 75 голов, и контрольная, обработанная аэрозольно йодистым алюминием, – также 75 голов. Количество телят, заболевших бронхопневмонией в опытной группе, составило 9 голов (10,7%), в контрольной – 25 (33,3%). Применение эндоглиюкина позволило более чем в 3,1 раза снизить заболеваемость бронхопневмониями. В контрольной группе был вынуждено убит 1 теленок (1,3%). Среднесуточный прирост у телят опытной группы составил 605,3 г, а контрольной – только 529,1 г.

В третьей серии опытов эндоглиюкин в дозе 1 тыс. ЕА вводили 15–60-дневным телятам по той же схеме. В этом опыте группа телят (опытная), обработанная эндоглиюкином, включала 103 головы, а контрольная, обработанная аэрозольно йодистым алюминием, – 98. Количество телят, заболевших бронхопневмонией в опытной группе, составило 14 голов (13,6%), в контрольной – 29 голов (29,6%). Применение эндоглиюкина позволило более чем в 2,2 раза снизить заболеваемость бронхопневмониями. В контрольной группе было вынуждено убито 3 теленка (3,1%). Среднесуточный прирост у телят опытной группы составил 621,1 г, а контрольной – только 542,5 г.

Таким образом, профилактическое применение эндоглиюкина при бронхопневмонии телят позволяет снизить заболеваемость от 2,2 до 3,1 раза.

Изучение лечебного действия эндоглиюкина. С лечебной целью эндоглиюкин назначали телятам с острым течением болезни в дозе 1 тыс. ЕА вводили 30–60-дневным телятам на 2–3-й день после перевода их в секцию. Повторную обработку проводили 2–3 раза через 2 дня после первого введения препарата. Как опытная группа телят, обработанная эндоглиюкином,

так и контрольная, обработанная аэрозольно йодистым алюминием, – включали по 57 голов. Количество выздоровевших телят в опытной группе составило 55 голов (96,5 %), в контрольной – 50 голов (87,6 %).

Таким образом, препарат эндоглиюкин в сочетании с лекарственными средствами, показанными для терапии легочной патологии, обладает лечебной эффективностью при бронхопневмониях телят [14].

Заключение. Препарат эндоглиюкин предупреждает массовое заболевание вирусными респираторными заболеваниями телят в 15–30-дневном возрасте. С этой целью препарат в дозе 1 тыс. ЕА в 10 мл раствора вводится интраназально (по 5 мл в каждую ноздрю) двукратно. Первое введение эндонуклеазы целесообразно производить в момент комплектования группы (секции), которое должно производиться в сжатые сроки (2–4 дня). Второе введение ферментного препарата производится одновременно животным всей группы через 7 дней после первой обработки последних животных. Таким образом, интервал между первой и второй обработкой у животных всей группы составляет 7–10 дней.

Эндоглиюкин в количестве 50000 ЕА (содержимое одного флакона) растворяют в 500 мл кипяченой воды при комнатной температуре и в этот раствор добавляют 0,62 г магния сернокислого (активатор фермента). Эндоглиюкин в количестве 10000 ЕА (содержимое одного флакона) растворяют в 100 мл кипяченой воды при комнатной температуре и в этот раствор добавляют 0,12 г магния сернокислого (активатор фермента).

Раствор эндоглиюкина рекомендуется хранить в холодильнике при 4–8 °С не более суток. Для получения аэрозоля применяют аппарат Шилова (или аналогичный), позволяющий дозировать приготовленный раствор. Раствор препарата вводят телятам по 5 мл в каждую ноздрю в носовые ходы в виде мелкокапельной струи (суммарная доза для одного теленка составляет 1000 ЕА). Приготовленным раствором с суммарной активностью 10000 ЕА обрабатывают однократно не менее 10 телят, а с активностью 50000 ЕА – не менее 50 телят однократно. С профилактической целью телят 0,5–2-месячного возраста обрабатывают дважды через 7–10 дней. С лечебной целью телят обрабатывают эндоглиюкином интраназально 2–3 раза с интервалом в 2 дня в тех же дозах.

Профилактическое применение эндоглиюкина при бронхопневмонии телят позволяет снизить заболеваемость от 2,2 до 3,1 раза.

Препарат эндоглиюкин в сочетании с лекарственными средствами, показанными для терапии легочной патологии, обладает лечебной эффективностью при бронхопневмониях телят.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Комплекс* препаратов биологически активных веществ (нуклеиновых кислот, цитокинов, ферментов и пробиотиков) для обеспечения противоинфекционной устойчивости персонала МЧС / Ю.С. Аликин, Е.Д. Даниленко, Л.Р. Лебедев, В.Ф. Подгорный // Пути и направления совершенствования гражданской обороны, повышения безопасности населения и территорий муниципальных образований субъектов Российской Федерации Сибирского федерального округа: материалы науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2014. – С. 66–71.

2. *Трухачев А.А.* Действие ДНК-азы на синтез и размножение некоторых ДНК-содержащих вирусов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1968. – 22 с.

3. *Баталина Т.А.* Изучение действия панкреатической РНК-азы на размножение некоторых РНК-содержащих вирусов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1970. – 23 с.

4. *Салганик Р.И., Трухачев А.А., Баталина Т.А.* Противовирусное действие дезоксирибонуклеазы и рибонуклеазы // Ингибиторы вирусной активности. – Рига, 1972. – С. 147–152.

5. Полтев В.И., Талпалацкий П.Л., Салганик Р.И. Профилактика вирусного паралича пчел с помощью рибонуклеазы // XXIII Международный конгресс по пчеловодству (аннотации докл.). – М., 1971. – С.77–78.
6. Лесников Е.П., Салганик Р.И. Сведения о терапевтической эффективности ДНКазы при некоторых заболеваниях кожи и слизистых // Тез. докл. 3-го Всесоюз. съезда дерматовенерологов. – Горький, 1971. – С. 129.
7. Глухов Б.М. Динамика накопления специфических антител у больных клещевым энцефалитом при лечении рибонуклеазой // ЖМЭИ. – 1970. – № 2. – С. 56–58.
8. Лекарственные средства, применяемые в медицинской практике в СССР / под ред. М.А. Клюева. – М.: Медицина, 1989. – С. 104, 320–321.
9. Эндонуклеаза бактериальная – средство профилактики вирусного паралича пчел / Р.И. Салганик, С.Н. Загребельный, С.Ф. Грачева [и др.] // Ветеринария. – 1985. – № 5. – С. 42–44.
10. А.с. № 1422418 СССР. Способ борьбы с вирусными инфекциями насекомых // П.Л. Талпалацкий, Б.И. Бондурянская, Р.В. Выборнов [и др.] – № 4073281; Приоритет от 02.06.86; Зарег. 08.05.88.
11. Батуев Ю.М. Эндонуклеаза и эндоглиюкин – сравнивая эффективность // Пчеловодство. – 1992. – № 7–8. – С. 18–19.
12. Эндоглиюкин, препарат против вирусных заболеваний / Ю.С. Аликин, В.И. Масычева, В.П. Клименко, Ю.М. Батуев, О.Ф. Гробов // Пчеловодство. – 1996. – № 4. – С. 17–19.
13. Пат. № 2038776 РФ от 05.07.95. Средство «эндоглиюкин» для профилактики и лечения вирусных заболеваний пчел и стимуляции развития пчелиных семей / Л.Д. Детиненко, В.П. Клименко, В.Ф. Подгорный, Ю.С. Аликин, В.И. Масычева, О.Ф. Гробов, Ю.М. Батуев (Россия). – № 93003554/15; Заявлено 22.01.93; Опубл. 09.07.95, Бюл. № 19; Приоритет 22.01.93.
14. Аликин Ю.С., Клименко В.П., Сенженко Л.П. Использование препаратов на основе эндонуклеазы *Serracia marcescens* против респираторных болезней телят / Тез. докл. 1-й науч.-практ. конф. фак. вет. медицины НГАУ // Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 1997. – С. 13–14.

REFERENCES

1. Alikin Yu.S., Danilenko E.D., Lebedev L.R., Podgorniy V.F., *Puti i napravleniya sovershenstvovaniya grazhdanskoj oborony, povysheniya bezopasnosti naseleniya i territorij municipal'nyh obrazovaniy sub'ektov Rossijskoj Federacii Sibirskogo federal'nogo okruga* (Ways and directions of improving civil defense, improving the security of the population and territories of municipalities of the subjects of the Russian Federation of the Siberian Federal District), Proceedings of the Conference Title, Novosibirsk, 2014, pp. 66–71. (In Russ.)
2. Truhachev A.A., *Dejstvie DNK-azy na sintez i razmnozhenie nekotoryh DNK-soderzhashchih virusov* (The effect of DNA-aza on the synthesis and reproduction of certain DNA-containing viruses), Extended abstract of candidate's thesis, Novosibirsk, 1968, 22 p. (In Russ.)
3. Batalina T.A., *Izuchenie dejstviya pankreaticheskoj RNK-azy na razmnozhenie nekotoryh RNK-soderzhashchih virusov* (Study of the effect of pancreatic RNAASE on the reproduction of certain RNA-containing viruses), Extended abstract of candidate's thesis, Novosibirsk, 1970, 23 p. (In Russ.)
4. Salganik R.I., Truhachev A.A., Batalina T.A., *Ingibitory virusnoj aktivnosti*, Riga, 1972, pp. 147–152.
5. Poltev V.I., Talpalackij P.L., Salganik R.I., *XXIII Mezhdunarodnyj kongress po pchelovodstvu* (XXIII International Congress on Beekeeping), Abstracts of Reports, Moscow, 1971, pp. 77–78. (In Russ.)

6. Lesnikov E.P., Salganik R.I., *Svedeniya o terapevticheskoj effektivnosti DNKazy pri nekotoryh zabolevaniyah kozhi i slizistyh*, (3rd All-Union Congress of Dermatovenerologists), Abstracts of Papers, Gor'kij, 1971, 129 p. (In Russ.)
7. Gluhov B.M., *ZHMEI*, 1970, No. 2, pp. 56–58. (In Russ.)
8. Klyueva M.A. *Lekarstvennye sredstva, primenyaemye v medicinskoj praktike v SSSR* (Medicinal products used in medical practice in the USSR), Moscow: Medicina, 1989, pp. 104, 320–321.
9. Salganik R.I., Zagrebel'nyj S.N., Gracheva S.F., *Veterinariya*, 1985, No. 5, pp. 42–44. (In Russ.)
10. *A.s. № 1422418 SSSR. Sposob bor'by s virusnymi infekciyami nasekomyh* (A method for combating insect viral infections), No. 4073281, Priority from 02.06.86; Registered 08.05.88.
11. Batuev Yu.M., *Pchelovodstvo*, 1992, No. 7–8, pp. 18–19. (In Russ.)
12. Alikin Yu.S., Masycheva V.I., Klimenko V.P., Batuev Yu.M., Grobov O.F., *Pchelovodstvo*, 1996, No. 4, pp. 17–19. (In Russ.)
13. Pat. No. 2038776 of the Russian Federation dated 05.07.95.
14. Alikin Yu.S., Klimenko V.P., Senzhenko L.P., *Ispol'zovanie preparatov na osnove endonukleazy Serracia marcescens protiv respiratornyh boleznej telyat* (The use of drugs based on endonuclease *Serracia marcescens* against respiratory diseases of calves), Abstracts of the 1st Scientific and Practical Conference of the Faculty of Veterinary Medicine of NGAU, Novosibirsk, 1997, pp. 13–14. (In Russ.)/