
AUTOLOGOUS STEM CELLS THERAPY IN HORSES AND DOGS WITH CHRONIC OSTEOARTHRITIS

J. NICPOŃ, Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine,
<https://orcid.org/0000-0002-8168-6301>

P. ZIELIŃSKA, Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine,
<https://orcid.org/0000-0001-6767-8367>

Wrocław University of Environmental and Life Sciences,

Plac Grunwaldzki 51, 50-366 Wrocław, Poland

E-mail: museum@nubip.edu.ua

Abstract. One of the fastest growing areas of veterinary medicine over the past decade has been and still is the regenerative medicine. It focuses on the reconstruction of damaged tissues/organs to restore their physiological and functional performance. The aim of study was the use of cells called mesenchymal stem cells (MSC) as an alternative treatment method of osteoarthritis. Twelve dogs have been chosen for experiment aged 5 to 11 years. All animals were diagnosed with the degeneration of the elbow joint. The dogs were divided into 2 groups: 8 dogs formed the test group and the remaining 4 dogs formed the control group. The dogs from the first group were treated with autologous stem cells. The dogs in the control group received non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – mavacoxib for a period of 6 months. Clinical examination on the first day of the experiment showed signs of lameness of the 3rd and 2nd degree in all 12 dogs. The clinical tests performed on day 180 in the control group showed signs of gait disturbance at the unchanged level. The dogs undergoing treatment with the use of autologic stem cells did not show any movement disorders. The obtained results allow drawing the conclusion that the combination of the lowest concentrations of metamizol may significantly increase the cytophysiological activity of the stem cells accompanied by the lack of morphological changes. The obtained data can be a valuable source of information for practicing veterinary doctors who introduce stem cells to treat musculoskeletal system diseases in both small and large animals.

Keywords: stem cells, mesenchymal stem cells (MSC), osteoarthritis, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), mavacoxib

Introduction & Analysis of recent researches and publications

One of the fastest growing areas of veterinary medicine over the past decade has been and still is the regenerative med-

icine. It focuses on the reconstruction of damaged tissues/organs to restore their performance – not only physiological, but also functional (Mason & Dunnill, 2008; Ratajczak et al., 2013). For this purpose somatic stem cells isolated from mature

tissues are used more and more frequently (Minguell et al., 2001; Mason & Dunnill, 2008; Zhu et al., 2008; Lai et al., 2011; Dimitrieva et al., 2012). Subsequently, the somatic cells reprogrammed into stem cells, referred to as Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs), are not taken into account in clinical use at this stage of the research due to their teratogenic nature. The population of stem cells which is the most frequently used in the context of veterinary medicine are Mesenchymal Stem Cells (referred to as MSC) isolated from fat (Eng. Adipose Stromal Cells – ASCS) as well as those isolated from the bone marrow (Eng. Bone Marrow Mesenchymal stem cells – BMSCs). Both mentioned populations of stem cells are multipotent cells, which means that in in vitro conditions they may differentiate into bone tissue, cartilage and adipose tissue (Barry & Murphy, 2004). Their indispensable and unique features are the ability to self-regenerate and the ability to divide up to thirty passages (Zuk et al., 2002; Zhu et al., 2008). This demonstrates their high cyto-physiological activity and ability to multiply extra-corporeally. In in vitro culture conditions, these cells are characterized by high adhesion and proliferation capacity, which allows their use not only for purely medical purposes, but also allows for breeding various kinds of implant material. The capacities of adhesion, proliferation, and differentiation of stem cells in in vitro conditions have become the basis for investigators to consider their potential application in the treatment of bone tissue and cartilage defects (Strem et al., 2005). Moreover, stem cells are of immunomodulatory nature and as it has been discovered recently they act as a nutrient for e.g. bone marrow stroma. The process of regenerating the damaged tissues, e.g. bone or cartilage tissues using stem cells can be carried out through both autocrine

and paracrine signaling. As has been described recently, the stem cells can synthesize and produce Microvesicles (MVs) into the damaged tissue, which first improves communication between the cells (called Inter cellular signaling – ICS). The mesenchymal cells synthesize and produce stem microvesicles which contain a number of growth factors including insulin-like growth factor, fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and bone morphogenetic proteins. It is well known that these factors play a key role in the process of regeneration of damaged tissues. The first stem cells which were widely described in literature are the cells isolated from bone marrow (Bone Marrow Stromal Cells – BMSCs) (Zuk et al., 2002). They are considered to be the progenitor cells of osteoblasts, chondroblasts and adipocytes. They are characterized by the presence of the following surface antigens CD73, CD90, CD105, and they do not express hematopoietic antigens (Zuk et al., 2002). Most frequently, especially in the case of large animals, the cells are isolated from the iliac crest or the sternum. They constitute only from 0.01 to 0.0001% of mononuclear cells of bone marrow and their number is closely correlated with the patient's age (Gonzales et al., 2009; Lai et al., 2011). In addition, the procedure of collecting bone marrow carries a high risk of infection every time, and in the case of collecting it from the sternum the further risk of damaging pericardial sac exists. Importantly, a small number of BMSCs cells collected from bone marrow requires a comparatively long in vitro culture, which translates to the need for delaying the therapeutic injection. For these reasons it becomes natural to search for other, more effective from cyto-physiological and practical viewpoint, sources of stem cells. Such a population constitutes stem cells isolated from the

adipose tissue (ASCs). These cells display expression of similar cell surface antigens to BMSCs and their collection procedure is undoubtedly safer and does not require general sedation of the patient. ASCs cells in contrast to BMSCs do not have antigen CD106 but they express the marker CD49d (Minguell et al., 2001; Strem et al., 2005; Zhu et al., 2008). Routinely, the adipose tissue for therapeutic purposes is collected under local anesthesia from the hypodermis in the case of small animals, and from around the base of the tail in the case of large animals. ASCs cells in *in vitro* conditions, similarly to BMSCs cells, differentiate into bone and cartilage cell tissues, which offers the possibility of their wide application in a clinical setting, as in the treatment of diseases of the loco-motor system. These diseases in the case of dogs and horses are under intense research aimed at developing the most effective methods and forms of treatment. Diseases and dysfunctions of the musculoskeletal system are disorders which have genetic origins or result from incorrect use in sports, injuries, improper nutrition or are related to overweight of the animal. The result is pain, reduced mobility, and consequently a significant reduction of life quality. Orthopedic diseases include congenital, developmental, traumatic and degenerative disorders. The most common musculoskeletal disorder in dogs is osteoarthritis. It is a chronic, multi-etiological dysfunction syndrome wherein as a result of biological and mechanical factors there occurs imbalance between the process of destruction and regeneration of the joint cartilage and the subchondral bone layer. Characteristic of this disease is a secondary inflammatory process of the synovial membrane of the joint, which is why the disease is commonly known as Osteoarthritis – OA. In the course of the disease there occurs

gradual thickening and loss of elasticity of the ligaments and joint capsule, resulting in a limitation of joint mobility and progressive muscular atrophy (Tuglu et al., 2010; Sandell, 2012). The degeneration process is accompanied by gradually increasing effort pain and stiffness of walk after rest, lasting no longer than 20 to 30 minutes and relieving on movement. The radiographic picture of joints initially shows a slight narrowing of the joint space and sclerosis of subchondral bone layer. Over time osteophytes appear at the edges of the joint surface and the footprint of the bone epiphysis is distorted. The synovial fluid cytology shows characteristic increase in the number of mononuclear cells (over 3000/ μ l) with a high proportion of synoviocytes. In advanced cases large numbers of erythrocytes and erythrophages are observed, which is a sign of severe damage to the synovial membrane.

In the case of horses one of the best described orthopedic disorders is bone spavin (Egenvall et al., 2010). Impaired movement is observed in the initial stage of the disease. After a longer rest the horse's walk is stiff, which discontinues after a few minutes of movement. The advanced stage of the movement disorder is manifested by significant lameness, with deformations observed on the antero-medial side of the tarsal joint. The disease is most common in older horses aged 8–10 years, but can also occur in young animals as so called “juvenile spavin”. The anatomy of the joint is considered the contributory factor to spavin occurrence. Greater force is applied to the central tarsal bone and tarsal bones I and II on the medial side. Other factors leading to the development of spavin include wrong posture (convergent / off line posture and its combinations), faulty shoeing, moving on hard surfaces. The spavin disease

may start to develop already during the first intensive training runs performed to achieve high physical performance in a short time. The greater overloads, e.g. due to jumps, the greater macro and micro injuries of the cartilaginous tissue, which have been considered the most important etiologic factor contributing to spavin disorder. Another cause of spavin is abnormal metabolism and inadequate nutrition, including disturbances in vitamin balance.

In the cases of severe lameness in both dogs and horses, surgery is the treatment of choice. In less severe cases, conservative drug therapy is applied using non-steroidal or steroidal anti-inflammatory drugs (Holloway et al., 2012). Full recovery is difficult due to the formation of the repairing deficient scar tissue and insufficient degree of tissue regeneration. Because the treatment with anti-inflammatory drugs only reduces the symptoms that accompany the degeneration process, an attempt has been made to apply a novel method using auto-logic stem cells. It has been proven that these cells release a number of factors desirable for regeneration such as: aggrecan, connective tissue growth factor (CTGF), bone morphogenetic proteins (BMPs), transforming growth factor (TGF) and others.

Purpose. The aim of study was the use of cells called mesenchymal stem cells (MSC) as an alternative treatment method of osteoarthritis. Stem cells are defined as a self-renewing population capable of differentiating into many distinct types. However, the division was adopted determining both their source and their capabilities. Embryonic stem cells (ES) are the most primitive form of cells. They form the embryo, but also placenta, giving rise to all the tissues of the developing organism – they are totipotent.

They are characterized by unlimited ability to divide. The second subgroup are the mature stem cells found in individuals in the postnatal life period in many mature tissues. It is believed that they form a reserve of undifferentiated cells necessary for maintaining the structure and the function of a given tissue. The possibilities of their differentiation are usually limited to a form of tissue within a given germ layer (they are pluripotent), however exceptions to the rule have been shown experimentally. In vitro studies have repeatedly demonstrated their high capacity to proliferate over a relatively long period of time, in addition to the ability to transform into a fully organized tissue fragments (Hackett, 2013). They are convenient research material because their isolation does not entail ethical controversy as in the case of embryonic stem cells. Publications report new types of tissue which showed the presence of mature stem cells (Minguelle et al., 2001; Zuk et al., 2002; Zhu et al., 2008; Gonzales et al., 2009; Lai et al., 2011). Their traditional and earliest known sources are bone marrow and umbilical blood. It is currently believed that these cells are found in every tissue but in different numbers. They were found e.g. in the skin, epithelia or even the brain (Tuglu et al., 2010). There are more of them identified in tissues undergoing constant self-regeneration. These cells were first isolated in 2001 from the adipose tissue obtained by liposuction. They have been proven to be multipotent by transforming them in vitro into several types of tissues. Despite differences in the expression of certain surface proteins, their nature is similar to those received from the bone marrow. Low invasiveness is the key advantage of this method of obtaining. The number of mesenchymal cells isolated during one process is also higher due

to larger volume of the source material. Cells divide well under culture conditions and maintain their multipotent capacity for many weeks. This approach allows obtaining a multiple of the original explant. Grafts of autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) proved to be safe and effective for the patient.

The joint degeneration disease – osteoarthritis – is a chronic incurable disease of inflammatory and degenerative etymology. It is caused by damage to the cartilaginous layer induced by long-lasting inflammation as a result of imbalanced anabolic and catabolic processes in the cartilage. Even after the elimination of inflammation, the tissue does not regenerate. Exactly these observations led me to develop a new therapeutic method using autologous graft AD-MSC not only to reduce the ongoing inflammatory process but also to initiate regeneration processes. One of the factors secreted by AD-MSC is IL-1ra, which as the receptors antagonist for IL-1 inhibits the cascade of postinflammatory reactions. Furthermore, the growth factors sent to the environment support the reconstruction of cartilage hence enabling it to return to the original physiological condition. A comparably high significance in filling in defects in the cartilage holds the sole differentiation of stem cells towards chondrocytes. The past encouraging results of analyzes carried out by scientific research teams in the world give the basis to more detailed studies of autologous stem cell injections in the course of the loco-motor system related diseases in dogs and horses (Black et al., 2008; Guercio et al., 2012; Marycz et al., 2012; Burk et al., 2013). Experiments with the use of autologous stem cells were performed in dogs (Experiment No. I) and horses (Experiment No. II).

Materials and methods of research

Twelve dogs have been chosen for experiment No. I (7 males and 5 females) aged 5 to 11 years, including: German Shepherd (4), Labrador (2), Boxer (2) and a mixed breed (4). All animals were diagnosed with the degeneration of the elbow joint, lasting for at least 5 months. The body weight of the patient dogs ranged between 25–50 kg of body weight. Before the selection all the patients underwent a blood test to assess their general condition and exclude comorbid disorders. During the clinical examination all dogs exhibited abnormal gait characteristic of osteoarthritis (OA): lameness – both in gait and trot (2nd and 3rd degree in 6 grade scale) and limited mobility as well as pain during manipulation. The computed tomography (CT) which was performed on all the chosen dogs revealed the 2nd and 3rd degree of degeneration of joints (in four-grade scale). Additionally punctures were performed and the collected liquid samples were transferred to the laboratory for test. Due to the similarity of clinical symptoms the dogs were divided into 2 groups: 8 dogs formed the test group and the remaining 4 dogs formed the control group. The dogs from the first group were treated with autologous stem cells. The dogs in the control group received non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – mavacoxib in the dose of 2 mg/kg of body weight (Trocoxil) for a period of 6 months. The dogs from the test group were subjected to sedation with medetomidine in a dose of 20µg/kg of body weight, i.m. and butorphanol in a dose of 0.2 mg/kg of body weight i.m. The area of the iliac crest was prepared according to the principles of surgical cleanliness. Subsequently infiltra-

1. Clinical study of dogs with osteoarthritis on the first day of experiment (n = 12)

	Procedure	Lameness in gait (1-6)	Lameness in trot (1-6)	Pain during manipulation (1-3)	Scope of movement (1-4)	Degree of disability (1-5)
Patient 1	SC	3	3	3	3	3
Patient 2	SC	2	3	2	2	2
Patient 3	SC	2	2	3	2	3
Patient 4	SC	3	3	3	3	3
Patient 5	SC	2	3	2	2	2
Patient 6	SC	1	2	2	2	2
Patient 7	SC	3	3	3	4	3
Patient 8	SC	2	1	2	2	2
Patient 9	control	3	3	3	3	3
Patient 10	control	2	3	3	3	3
Patient 11	control	3	3	3	3	3
Patient 12	control	3	2	2	3	3

Note: SC – autologic stem cells administered; control – NSAIDs – mevacoxib 2 mg/kg.

tion anaesthesia was administered with 2 % lidocaine solution and the sample of about 5 grams of fat was collected in order to isolate and multiply stem cells in laboratory conditions. The samples of

the adipose tissue were processed under sterile conditions using a laminar chamber of the 2nd class of cleanliness. The sample sections were thoroughly rinsed with Hanks Salt solution, crushed and

2. Examination of the synovial fluid collected from the elbow joint in dogs with osteoarthritis on the first day of experiment (n = 12)

Patient	Colour	Clarity	Viscosity	Leukocyte number (×103)	Neutrophils (%)	Mononuclear cells
1	colorless	slightly cloudy	reduced	3	9	98
2	light yellow	slightly cloudy	correct	4	10	96
3	colorless	slightly cloudy	correct	3	5	94
4	colorless	transparent	correct	4	12	96
5	colorless	slightly cloudy	reduced	3	14	98
6	light yellow	transparent	correct	5	10	93
7	colorless	slightly cloudy	reduced	5	8	95
8	colorless	transparent	reduced	4	10	94
9	light yellow	transparent	reduced	5	9	90
10	colorless	slightly cloudy	reduced	6	12	92
11	light yellow	slightly cloudy	correct	4	8	94
12	light yellow	transparent	correct	3	7	92

devoided of blood and blood vessels. The samples were then etched with collagenase (5mg/mL) for 40 minutes at 37 °C and then centrifuged for 10 minutes at the force of 1200xg (Yasuda et al., 2011). The unetched tissue was removed together with the supernatant and the

mononuclear cells located at the bottom of the tube were suspended in the culture medium (DMEM: F12 / Ham's supplemented with 10 % bovine fetus serum and 1 % penicillin / streptomycin / amphotericin b) and placed in culture flasks T-25cm³. Such cultures were maintained

3. Examination of synovial fluid sampled from the tarsal joint of the horses diagnosed with spavin on the first day of the experiment (*n* = 16)

	Apper- ance	Clarity	Viscosi- ty, cm	Total protein, g/dL	Mucin clot	Leuko- cytes, cells/ μ L	Neutro- phils, %
1. Test group	yellow	opaque	2	2,7	correct	8.000	< 15
2. Test group	yellow	opaque, single flocculent material	< 2	3,5	relative- ly good	5.500	< 12
3. Test group	yellow	clear	< 2	2,8	correct	5.000	< 10
4. Test group	yellow	clear	4	3.5	correct	4.600	< 15
5. Test group	light yellow	slightly cloudy	< 2	2,6	correct	8.500	< 15
6. Test group	yellow	opaque, single flocculent material	1	2,7	relative- ly good	7.000	<15
7. Test group	yellow	opaque	< 2	2,9	correct	6.000	< 13
8. Test group	light yellow	clear	4	3,0	correct	5.000	< 15
9. Test group	yellow	flocculent opaque	2	2,4	relative- ly good	9.000	< 13
10. Test group	yellow	slightly cloudy	2,5	3,2	good	7.500	< 14
11. Comparison group	yellow	clear	2	3	correct	5.000	< 12
12. Comparison group	light yellow	slightly cloudy	< 2	2,5	correct	7.500	< 15
13. Comparison group	light yellow	clear	1	2,8	correct	4.500	< 13
14. Control group	yellow	opaque, single flocculent material	< 1	2,7	relative- ly good	8.000	< 15
15. Control group	yellow	clear	< 2	2,4	correct	6.000	< 10
16. Control group	light yellow	clear	< 1	2,6	correct	4.000	< 15

Note: Results of the research conducted on dogs (Experiment no. I.).

at 37 °C/5 % CO₂/95 % humidity for 3–4 days. At full confluency, the cells were passed into culture vessels T-75 (using the reagent TrypLE Express) and grown in the proliferation medium (DMEM – 4500 mg/L glucose, 15 % bovine fetus serum) for 9 days. Microbiological purity was controlled during the entire cycle with the use of an inverted microscope. Then the cells were collected, suspended in sterile physiological saline, counted using a hemocytometer and their viability was checked using the trypan blue dye test. One ml of the suspension (5×10⁶ cells/ml) was collected in a syringe and immediately transported to the clinic, where after preparation of the injection area in accordance with the principles of surgical cleanliness it was injected into the elbows of 8 dogs from the test group.

The following tables show the dogs' qualification criteria for Experiment I.

Parallel studies were conducted in horses diagnosed with the spavin disease confirmed by clinical examination, X-ray examination and diagnostic anesthesia (Experiment II). The experiment group consisted of 16 animals aged 8 to 14 years, 10 of which constituted the test group, 3 formed a comparison group, and subsequent 3 formed a control group. The adipose tissue samples in the amount of 3–4 g each were collected from around the base of the tail of the 10 horses under local anesthesia (40 mg Lignocaina/mL). The collected material was placed in sterile saline solution and transferred to the laboratory for propagation of autologic stem cells. The resulting suspension in the amount of 5×10⁶ cells in 1ml was deposited into the tarsal joint. The comparison group was administered 1 mL betamethasone intraarticularly, preparation Diprophos (6.43 mg betamethasoni dipropionas + 2.63 mg betamethasoni natrii phosphas) after preparing the injection area in ac-

cordance with the principles of surgical cleanliness. The remaining three horses in the control group were only recommended limited movement.

The control study consisted in examination of synovial fluid, which was conducted on the first day and after 90 and 180 days – clinical tests on days 30, 60, 90 and 180, and X-ray, which was performed on day 180 of the experiment. Additionally 6 horses (2 horses in the test group, 2 in the comparison group, and 2 in the control group) underwent scintigraphic examination on days 1, 90 and 180.

The following tables show the selection criteria of horses in Experiment II.

Results of the research and their discussion

Clinical examination on the first day of the experiment showed signs of lameness of the 3rd and 2nd degree in all 12 dogs in some cases manifested more strongly in gait and in other cases in trotting (Table 1). On day 60 a slight improvement was observed in the test group that underwent stem cell therapy. The dogs demonstrated reduced lameness in the gait and trot as well as a lower reaction to pain on manipulation. In contrast, the control group exhibited a slightly higher pain reaction. On day 90 the clinical test results in the control group remained unchanged. However, the results of tests in the test group continued to improve. The prior symptoms such as stiff gait, lameness or pain were observed in only 3 out of 8 dogs. The clinical tests performed on day 180 in the control group showed signs of gait disturbance at the unchanged level. However, higher pain reaction was observed especially on manipulation. The dogs undergoing treatment with the use

4. Examination of synovial fluid sampled from the elbow joint in the dogs with osteoarthritis on day 90 of the experiment ($n = 12$)

Patient	Colour	Clarity	Viscosity, cm	Leukocyte number	Neutrophils, %	Mononuclear cells
1	colourless	clear	4	2	4	95
2	light yellow	slightly cloudy	3	2	3	93
3	colourless	clear	5	1	0	94
4	colourless	clear	3	3	5	93
5	light yellow	slightly cloudy	reduced	4	5	96
6	light yellow	clear	5	2	3	92
7	colourless	clear	4	2	2	93
8	colourless	clear	4	3	3	91
9 control	light yellow	slightly cloudy	3	6	7	93
10 control	colourless	slightly cloudy	reduced	7	6	94
11 control	colourless	slightly cloudy	reduced	6	8	96
12 control	light yellow	slightly cloudy	3	5	10	94

Note: Control – NSAIDs – mevacoxib 2 mg/kg.

of autologic stem cells did not show any movement disorders. Symptoms such as lameness in gait and trot and pain on manipulation have been completely reduced. Only the scope of motion of the joints remained at a stable, limited level.

Synovial fluid analysis results corresponded to the clinical picture of the patients. On the 1st day of the experiment all 12 dogs showed traits characteristic of chronic degeneration (Table 2). The level of leucocytes was below $6 \times 10^3/L$, neutrophils between 5–12 % and mononuclear cells ranged between 86–98 cells per field. The color of the collected synovial fluid ranged from light yellow to colorless, and in 7 cases it was slightly cloudy. On day 90 the parameters for the dogs in the control group deteriorated. The liquid became slightly turbid and a quite noticeable increase was observed in the levels of neutrophils, leu-

kocytes and mononuclear cells. The test results of the treated group improved. The synovial fluid remained cloudy in only 2 cases and reduced viscosity was still observed in only 1 out of 8 dogs. Other parameters remained within normal limits, the number of leucocytes between $1-4 \times 10^3/L$ and the neutrophil value dropped below 5 %. On day 180 the analysis of the synovial fluid in the control group showed that the results obtained were similar to those obtained in the examination on day 90. The leucocytes remained at the same level and a slight increase was observed in the number of neutrophils and mononuclear cells. However, the synovial fluid in patients in the test group did not show characteristics of chronic inflammation. The levels of leukocytes, neutrophils and mononuclear cells were normal. In one case persistent turbidity of the

fluid was reported but in the remaining patients it was clear, ranging from light yellow to colorless of proper viscosity.

The CT scan performed on the first day of experiment proved that the image of elbow in all the dogs was characteristic of a chronic degenerative disease. On day 180 the inflammation persisted in dogs in the control group but in those undergoing stem cell therapy only the persistent lack of mobility in the joint was observed. No features characteristic of an ongoing inflammation were observed.

Results of the research on horses (Experiment no. II): In the experiment on horses (II), the clinical test performed on the first day of the experiment exhibited strong lameness in all animals under research. The X-ray images showed slight degenerative changes characteristic of the early

manifestations of the spavin disease in the tarsal joint. The scintigraphy performed on the first day on all six horses exhibited a strong concentration of radionuclide in the tarsal joint area called a hot-spot proving an ongoing inflammation. In a clinical trial in 10 horses undergoing stem cell therapy (horses no. 1–10), there was no change in the clinical picture observed on day 30 after implantation; however the degree of lameness decreased significantly after 60 days. In the case of horses of the comparison group which received the steroidal anti-inflammatory drugs (horses no. 11–13), significant improvement and the absence of clinical symptoms were observed after 30 and 60 days of the experiment. In the control group (horses no. 14–16) lameness remained unchanged after 30 and 60 days of the experiment.

5. Examination of synovial fluid taken from the elbow joint in the dogs with osteoarthritis on day 180 of the experiment ($n = 12$)

Patient	Colour	Clarity	Viscosity, cm	Leukocyte number	Neutrophils, %	Mononuclear cells
1	colourless	clear	4	1	3	91
2	light yellow	slightly cloudy	3	3	4	86
3	colourless	clear	5	2	0	92
4	colourless	clear	3	3	4	90
5	light yellow	clear	3	3	4	92
6	light yellow	clear	5	2	3	92
7	colourless	clear	4	3	2	91
8	colourless	clear	4	2	2	90
9 control	light yellow	slightly cloudy	3	7	7	95
10 control	colourless	slightly cloudy	reduced	8	7	98
11 control	light yellow	slightly cloudy	reduced	6	10	98
12 control	light yellow	slightly cloudy	reduced	5	12	97

Note: Control – NSAIDs – mevacoxib 2 mg/kg.

The scintigraphic examination after 90 days showed no symptoms of arthritis in 4 horses (2 of the test group and 2 of the comparison group), while the inflammation still persisted in 2 horses in the control group.

The clinical study after 90 days showed no signs of lameness in 13 horses (10 of the test group and 3 of the comparison group), while in 3 horses in the control group the signs of lameness were still strongly manifested.

The clinical examination after 180 days identified:

- test group – no lameness
- comparison group – average degree of lameness
- control group – slight decrease in the degree of lameness.

The scintigraphic examination after 180 days showed persistent inflammation in 2 horses of the control group, and a relapse of inflammation in 2 horses of the comparison group, whereas in the case of horses from the test group no concentration of a radiopharmaceutical (technet 99) was observed around the tarsal joint, which proved the lack of inflammation.

The X-ray images after 180 days showed no significant changes compared to the examinations made on the first day of the experiment. The synovial fluid examination on the first day showed symptoms of inflammation in all horses under experiment.

The results of the examination performed after 90 days improved significantly in the test group and the comparison group. The synovial fluid showed no inflammatory features. The appearance, viscosity, total protein concentration and the number of cells were within the norm for a healthy joint, which indicated no significant differences in the initial treatment of both groups. In contrast, the reduction in the number of neutrophils observed in the control group indicated the transition of the inflammation into its chronic form.

Upon receiving similar results of the therapy in the comparison group and the test group it was decided to repeat the examination of the synovial fluid after 180 days. No significant differences compared to the examinations performed after 90 days were noted in the control group. In the case of the test group undergoing stem

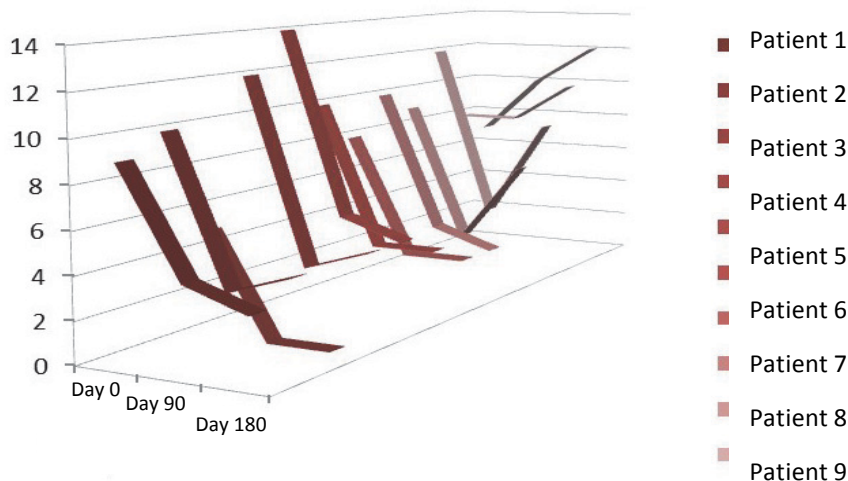


Fig. 1. Changes in the amount of neutrophils in synovial fluid in the test group of 10 horses treated with stem cell therapy

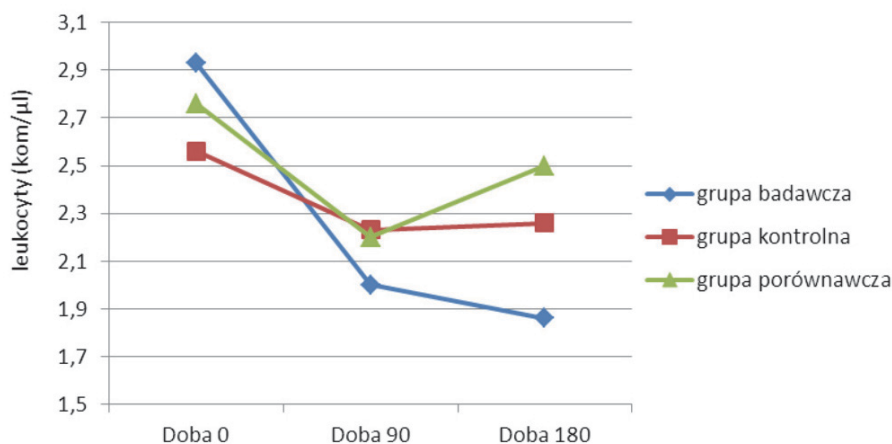


Fig. 2. Change in the amount of leukocytes in the synovial fluid in the three groups under research within 180 days

cell therapy, the results were still within the normal range of a healthy joint, and the level of leukocytes continued to drop (it was impossible to repeat sampling in 2 out of 10 horses). In the case of comparison group treated with steroidal anti-inflammatory drugs the examination performed after 180 days showed a significant increase in the number of inflammatory cells and total protein concentration, a slight decrease in viscosity and in 2 cases (out of 3 under examination) a change of color and the appearance of turbidity in comparison to the examination performed on day 90 of the treatment. The obtained results indicate the reemission of inflammation and short-term effects of treatment with anti-inflammatory drugs.

To sum up, the treatment with autologic stem cells showed a significant improvement in both dogs and horses under research. The symptoms such as stiff gait, pain and lameness were significantly reduced while in the control group, which did not undergo any treatment, they significantly increased. The novel method of treatment using an intraarticular injection of autologic

stem cells meets modern requirements for therapies. It is a safe method which provides long-term anti-inflammatory effect, improves joint mechanics and does not cause harmful side effects.

In the case of degeneration of the elbow joint in dogs or spavin disease in horses, the autologic stem cells therapy can reduce discomfort and diminish clinical symptoms associated with these diseases, which has a significant impact on improving the functioning of the animal, and especially on inhibiting the progression of the disease and the elimination of the constant application of analgesics.

In view of the fact that only a slight reduction of pain symptoms was observed in the initial phase after the implantation of stem cells in both dogs and horses, it was decided to further investigate the effect of selected steroid and non-steroidal anti-inflammatory drugs in in vitro conditions on the morphology, ultrastructure and cytophysiological activity of stem cells. The investigated drugs included steroids (betamethasone / methylprednisolone acetate) routinely used in clinical setting as well as nonsteroidal (metamizol). The results indi-

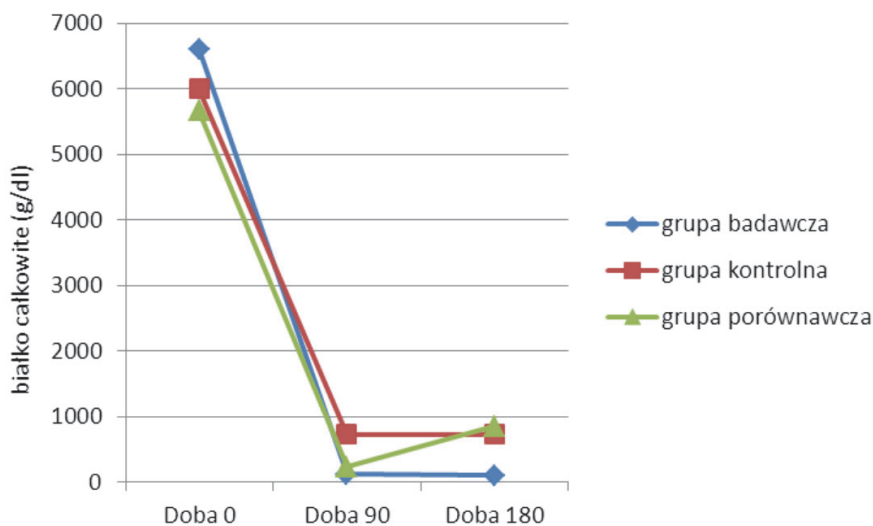


Fig. 3. Change of the total protein concentration in the synovial fluid in 16 horses under research within 180 days

cate a positive cellular response of ASCs to both tested drugs depending on the dosage used. The stem cells isolated from the adipose tissue of horses (equine adipose derived mesenchymal stem cells – EqASC), were characterized by a higher rate of proliferation when the applied dose amounted to 0.01 mg/mL of both examined drugs. In addition, the discussed dose brought no morphological and ultrastructural changes in the cultured cells. The cells preserved fibroblast-like shape, bipolar morphotype, and centrally arranged nuclei. The same concentration of betametzone in turn significantly inhibited cell divisions prolonging population doubling (Population Doubling Time – PDT) of the ASCs. The culture of EqASC (Equine adipose derived mesenchymal stem cells) and CaASC (Canine adipose derived mesenchymal stem cells) using methylprednisolone acetate at a concentration of 0.01 mg/mL and 0.1 mg/mL resulted in an increase in the rate of proliferation of both studied stem cell populations. The 1 mg/mL concentration of methylprednisolone ace-

tate and betamethasone completely inhibited cell division in CaASC EqASC. Stem cells isolated from the adipose tissues of dogs and horses, cultured in the presence of both drugs at concentrations of 0.01 and 0.1 mg/mL, showed no morphological changes in the course of seven days of the experiment. The cells were characterized by a normal morphotype and created numerous intercellular junctions. The addition of 1 mg/mL of each of the test drugs to EqASC and CaASCs cultures led to significant changes in the cell morphology. Numerous apoptotic and necrotic cells were observed in the culture. Both drugs tested at doses of 0.1 mg/mL and 0.01 mg/mL stimulated EqASC and CaASC cells for the synthesis and secretion of membrane microfragments (MVs), which correlates with the high cytophysiological activity of the tested cells. The results indicate the possibility of incubating the stem cells in the pre-transplantation phase in order to increase their secretive capability and thus enhance their regeneration abilities (Ratajczak et al., 2013).

Similar results were obtained in the culture of EqASC and CaASC stem cells with nonsteroidal drug – metamizol. The application of the lowest concentration, i.e. 0.01 mg/mL, significantly stimulated the cells' division, thus shortening the population doubling time. The cells in the culture preserved the fibroblast-like morphotype with centrally located nuclei. In addition an increased number of intercellular junctions was observed together with increased cytophysiological activity of cells which was manifested by the presence of numerous membrane microfragments (MVs) located on the surface of the tested cells. The lowest concentration of the test drug resulted in an intensive synthesis and secretion of MVs in the case of CaASC, while in the case EqASC only single membrane microfragments were observed. The application of higher doses of the test drug, i.e. 0.01 and 0.1 mg/mL, inhibited the proliferation of the examined cells and consequently resulted in a complete inhibition of growth particularly when the dose of 1 mg/mL was applied. In the case of 0.1 mg/mL dose both cell populations exhibited uniform distribution and preserved their proper fibroblast-like shape. In the case of the highest concentration of the test drug, numerous apoptotic bodies were observed in both EqASCs and CaASCs cultures.

Conclusions and future perspectives of the study

The obtained results allow drawing the conclusion that the combination of the lowest concentrations of metamizol may significantly increase the cytophysiological activity of the stem cells accompanied by the lack of morphological changes. The obtained data can be a valuable source of information for practicing

veterinary doctors who introduce stem cells to treat musculoskeletal system diseases in both small and large animals.

References

- Barry, F. P. & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Stem Cells*, 36:568–584.
- Black, L. L., Gaynor, J., Adams, C., Dhupa, S., Sams, A. E., Taylor, R., Harman, S., Gingerich, D. A. & Harman, R. (2008). Effect of intraarticular injection of autologous adipose- derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet Ther*, 9:192–200.
- Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Juelke, H., Kasper, C., Staszky, C. & Brehm, W. (2013). Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet. J.*, 195:98–106.
- Dimitrieva, R. I., Minullina, I. R., Bilibina, A. A., Tarasova, O. V., Anisimov, S. V. & Zaritskey, A. Y. (2012). Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle*, 11:377–383.
- Egenvall, A., Lönnell, C., Johnston, C. & Roepstorff, L. (2010). Orthopaedic health status of horses from 8 riding schools – a pilot study. *Acta Vet. Scand.*, 52:2–8.
- Gonzalez, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D. & Delgado, M. (2009). Adipose derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*, 136:978–989.
- Guercio, A., Di Marco, P., Casella, S., Cannella, V., Russotto, L., Purpari, G., Di Bella, S. & Piccione, G. (2012). Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int*, 36:189–194.

- Hackett, C. H. (2013). Assessing the function of mesenchymal stromal cells: all that glitters is not gold. *Vet. J.*, 195:10–11.
- Holloway, H., Robinson, A. & Mialand, T. P. (2012). Benefits of continuous long-term treatment of canine degenerative joint disease with carprofen. *Rev. Méd. Vét.*, 163:95–104.
- Lai, R. C., Chen, T. S. & Lim, S. K. (2011). Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen. Med.*, 6:481–492.
- Marycz, K., Toker, N. Y., Grzesiak, J., Wrzeszcz, K. & Golonka, P. (2012). The therapeutic effect of autogenic adipose derived stem cells combined with autogenic platelet rich plasma in tendons disorders in horses in vitro and in vivo research. *J. Anim. Vet. Adv.*, 11:4324–4331.
- Mason, C. & Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Future Medicine*, 3:1–5.
- Minguell, J. J., Alejandro, E. & Paulette, C. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 226:507–520.
- Ratajczak, J., Kucia, M., Mierzejewska, K., Marlicz, W., Pietrzkowski, Z., Wojakowski, W., Greco, N. J., Tendera, M. & Ratajczak, M. Z. (2013). Paracrine roangiopoietic effects of human umbilical cord blood-derived purified CD133+ cells-implications for stem cell therapies in regenerative medicine. *Stem Cells Dev.*, 22:422–430.
- Sandell, L. J. (2012). Etiology of osteoarthritis: Genetics and synovial joint development. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 8(2):77–89.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K. & Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose-derived stem cells. *Keio J. Med.*, 54:132–141.
- Tuglu, M. I., Ozdal-Kurt, F., Koca, H., Sarac, A., Barut, T. & Kazanc, A. (2010). The contribution of differentiated bone marrow stromal cell-loaded biomaterial to treatment in critical size defect model in rats. *KafkasUniv Vet Fak Derg*, 16:783–792.
- Yasuda, K., Khandare, A., Burianovskyy, L., Maruyama, S., Zhang, F., Nasjletti, A. & Goligorsky, M. S. (2011). Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by endothelial progenitors: exchange of lysosomal pool. *Aging*, 3:597–608.
- Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X. & Cui, Z. (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Bioch. Funct.*, 26:664–675.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.*, 13:4279–4295.

Якоб Нікпон, Поліна Зелінська (2020). АУТОЛОГІЧНА ТЕРАПІЯ СТОVBУРОВИМИ КЛІТИНАМИ У СОБАК І КОНЕЙ З ХРОНІЧНИМ ОСТЕОАРТРИТОМ.

Ukrainian Journal of Veterinary Sciences, 11(2): 4–19, <https://doi.org/10.31548/ujvs2020.02.001>

Анотація. Однією з найбільш швидко прогресуючих галузей ветеринарної медицини за останнє десятиліття була і залишається регенеративна медицина. Основна увага приділяється реконструкції пошкоджених тканин / органів для відновлення їх фізіологічних та функціональних показників. Метою даного дослідження було використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) як альтернативного методу лікування остеоартриту. Для експерименту було обрано 12 собак у віці від 5 до 11 років. У всіх тварин діагностували дегенеративні зміни у ліктьовому суглобі. Собак розділили на 2 групи: 8 собак сформували тестову групу, а решта 4 собаки – контрольну групу.

У собак першої групи були застосовані аутологічні стовбурові клітини. Собаки контрольної групи отримували нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) – мавакоксиб протягом 6 місяців. Клінічне обстеження в перший день експерименту показало ознаки кульгавості 3-го та 2-го ступеня у всіх 12 собак. Клінічні тести, проведені 180 днів у контрольній групі, показали ознаки порушення ходи на незмінному рівні. У собак, які пройшли лікування із застосуванням аутологічних стовбурових клітин, не виявлено жодних порушень руху. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що поєднання найнижчих концентрацій метамізолу може значно підвищити цитофізіологічну активність стовбурових клітин, що супроводжується відсутністю морфологічних змін. Отримані дані можуть бути цінним джерелом інформації для практикуючих лікарів-ветеринарів, які впроваджують стовбурові клітини для лікування захворювань опорно-рухового апарату як у малих, так і у великих тварин.

Ключові слова: стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), остеоартрит, нестероїдні протизапальні засоби (НПЗП), мавакоксиб

Подано до друку 28 лютого 2020 року

МОРФО-МЕТРИЧНИЙ ОПИС ТАЗОВОЇ КІСТКИ ТА ПРОКСИМАЛЬНОГО ЕПІФІЗА СТЕГНОВОЇ У ЛЕЛЕКОПОДІБНИХ

Н. В. ДРУЗЬ, кандидат ветеринарних наук, старший викладач кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин ім. акад. В. Г. Касьяненко,
<https://orcid.org/0000-0001-8365-8526>
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: druz_nv3011@ukr.net

Анотація. Тазова кістка та проксимальний епіфіз стегнової є основними опорними складовими тазостегнового суглоба, а також являється ведучою ланкою вільної тазової кінцівки, яка надає їй значної рухливості, визначає її позицію за статики та локомоції. В процесі еволюції ці складові набувають значення своєрідного центрального амортизатора проти ударів, які отримує кінцівка у процесі руху.

На основі порівняльно-анатомічного аналізу викладено особливості скелетних елементів тазової кістки та проксимального епіфіза стегнової деяких лелекоподібних як основних елементів тазової кінцівки в цілому. Встановлено, що морфометричні особливості скелетних елементів досліджених птахів, зумовлені специфічним біпедальзмом, що полягає у розташуванні осі тіла відносно тазових кінцівок та забезпечує утримання тіла між двома кінцівками. Визначено, що досліджені структурні елементи відрізняються за формою та розмірами.

Встановлено, що серед досліджених лелекоподібних найкоротша стегнова кістка щодо загальної довжини кінцівки у чаплі білої становить $12,2 \pm 0,2$. Найдовшу ж стегнову кістку щодо загальної довжини кінцівки виявлено у косаря ($35,3 \pm 0,5$). Це свідчить про те, що коротка стегнова кістка характерна птахам, які максимально адаптовані до водоплавної локомоції і скоріше за все, це викликано необхідністю щільно притискати тазову кінцівку до тулуба в ділянці стегна під час плавання. Більш довга стегнова кістка забезпечує більш віддалені точки фіксації глибокого сідничо-стегнового, краніального клубово-вертлужного та хвостово-стегнового м'язів, збільшуючи водночас їхню згинальну та розгинальну функцію щодо стегна. Серед досліджених *Ciconiiformes* показник найменшої довжини тазу до його ширини коливається від 31,2 до 68,0 %. Це свідчить про те, що чим ширший таз, тим більші яйця може відкладати самка даного виду.

Ключові слова: тазова кістка, стегнова кістка, ряд лелекоподібні, чапля сіра, чапля руда, чапля біла, кваква звичайна, лелека білий, коравайка, ібіс, косар

Актуальність

Неможливо обійти стороною значну роботу з морфології та систематики птахів Fürbringer (1988), оскільки виконаний в ній опис топографії і макроскопічної будови кісток та м'язів залишається основою для формування загальних і конкретних уявлень про їх будову у представників класу птахів. Проте, ці вже класичні роботи потребують певного перегляду, проведеного на основі новітніх досягнень порівняльно-анатомічної науки.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Серед робіт із функціональними підходами до вивчення скелету вільної тазової кінцівки слід відмітити роботи Kurochkin (1971). Для встановлення специфіки морфології та функції тазової кінцівки плаваючих та пірнаючих птахів автор використав порівняння даних щодо стегна, гомілки, малогомілкової кістки та інших елементів тазової кінцівки у різних екологічних груп птахів.

В ряді своїх публікацій Bogdanovich (1997, 2004, 2011) наводить данні щодо скелету тазової кінцівки тетерукових, нандуподібних, пастушкових та представників декількох інших рядів. Автор зазначає, що опір кісток на згин досягається за рахунок рознесення компактної речовини від центру тяжіння, що більш оптимально у порівнянні із збільшенням її кількості.

Підсумовуючи наведений вище літературний огляд, можна зробити висновок, що лише в невеликій кількості робіт присутній чіткий, якісний анатомічний опис та аналіз кісткових структур локомоторного апарату в цілому (Gadow & Selenka, 1891; Maurer,

1977; Berman, 1982; Bannasch, 1986; Cracraft & Clarke, 2001). Дослідження, виконані на широкому порівняльно-анатомічному матеріалі, дуже незначні. Тому відчувається гостра необхідність вивчення характеристик та особливостей суглобів тазової кінцівки птахів для розуміння видових особливостей та адаптації того чи іншого виду птахів у певному, притаманному йому середовищі існування.

Тільки шляхом глибокого та всебічного аналізу можна розкрити сутність процесів адаптації, які пов'язані з морфогенезом скелета. Адже попередні дослідження свідчать, що скелет (зокрема елементів локомоторного апарату) птахів морфологічно більш різноманітний порівняно з м'язами (Druz & Melnik, 2012; Druz & Zoloyilo, 2018; Shatkovska et al., 2018; Druz & Savchuk, 2019). Тому цим і пояснюється вибір для дослідження саме скелетних елементів.

Метою даної роботи було провести морфо-метричний опис тазової кістки та проксимального епіфіза стегнової у деяких лелекоподібних.

Матеріали і методи дослідження

Робота виконана на кафедрі анатомії, гістології і патоморфології тварин ім. акад. В. Г. Касьяненка Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ, 2016–2019 рр.). Дослідження проводились на статевозрілих птахів ряду лелекоподібні (*Ordo Ciconiiformes*), а саме: чапля сіра (*Ardea cinerea*), чапля руда (*Ardea purpurea*), чапля біла або чепура велика (*Ardea alba*), кваква звичайна (*Nycticorax nycticorax*), лелека білий (*Ciconia Ciconia*), лелека чорний (*Ciconia nigra*), бугай (*Botaurus*

stellaris), коравайка (*Plegadis falcinellus*), ібіс (*Threskiornis*) та косар (*Platalea leucorodia*).

Середня маса тіла досліджених видів птахів становила: чапля сіра – $1400 \pm 0,56$ г, чапля руда – $1200 \pm 0,29$ г, чепура велика – $1100 \pm 2,6$ г, кваква – $540 \pm 3,1$ г, лелека білий – $3200 \pm 4,4$ г, лелека чорний – $2800 \pm 3,1$ г, бугай – $7500,62$ г, коровайка – $630 \pm 3,3$ г, ібіс – $1300 \pm 1,29$ г, косар – $1600 \pm 1,56$ г.

Остеометрію проводили за допомогою штангенциркуля та метра, за розробленою нами схемою (рис. 1). Назви анатомічних структур тазової кістки та прооксимального епіфіза стегнової, описували відповідно до уніфікованої латинської номенклатури з анатомії птахів (*Nomina anatomica avium*), яка оновлювалась

та перевипускалась пізніше. Подані оригінальні докладні ілюстрації.

Схема остеометричних промірів: А – скелет птаха; В – каудальна поверхня проксимального епіфіза стегнової кістки; С – дорсальна поверхня проксимального епіфіза стегнової кістки; D – суглобова западина тазової кістки; Е – дорсальна поверхня тазової кістки; L – довжина тазової кінцівки – відстань від проксимального кінця вертлюга стегнової кістки до кінця кігтя середнього пальця; L_1 – довжина стегнової кістки – відстань від проксимального кінця вертлюга стегнової кістки до латерального виростка дистального кінця стегнової кістки; L_2 – найбільша довжина тазового поясу – відстань від краніальної дуги клубової кістки до каудальної поверх-

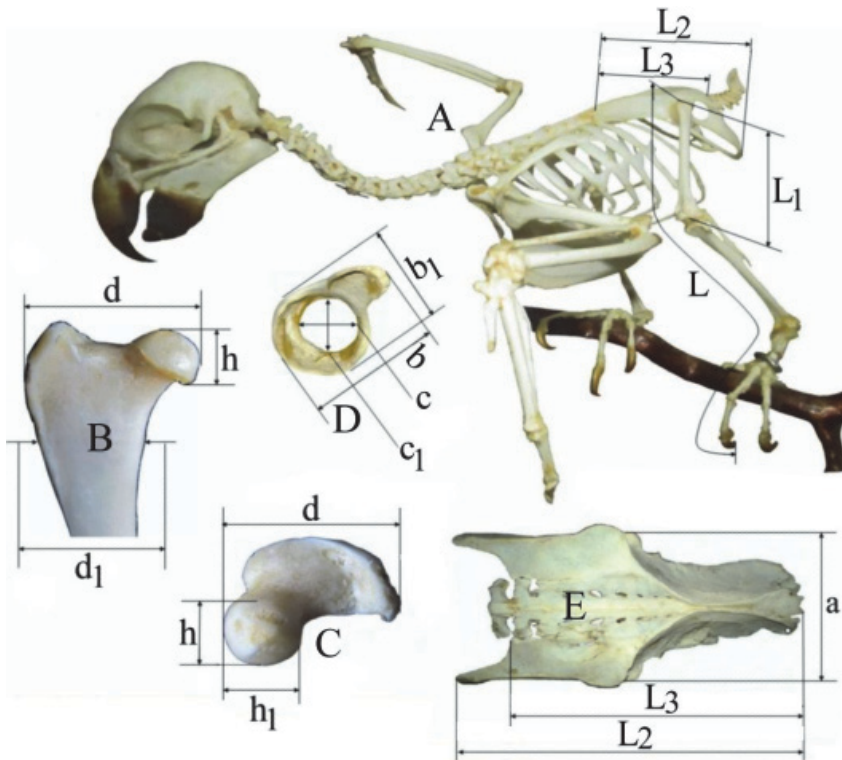


Рис. 1. Схема остеометричних промірів

ні лобкової; L_3 – найменша довжина тазового поясу – відстань від краніальної дуги клубової кістки до каудальної поверхні сідничої; a – ширина тазу – відстань між латеральними краями противертлюгів лівої та правої тазових кісток; b – висота суглобової западини – відстань від дорсальної поверхні противертлюга до вентральної дуги суглобової западини; b_1 – ширина суглобової западини – відстань від краніальної поверхні суглобової западини до каудальної; c – ширина суглобового отвору – відстань від краніальної поверхні суглобового отвору до каудальної; c_1 – висота суглобового отвору – відстань від дорсальної поверхні суглобового отвору до вентральної; d – ширина кінця стегнової кістки на рівні її голівки – відстань від латеральної поверхні проксимального епіфіза стегнової кістки до медіальної поверхні голівки стегнової кістки; d_1 – ширина стегнової голівки під вертлюгом – ширина проксимального діяфіза стегнової кістки; h – висота голівки стегнової кістки – відстань від її дорсальної поверхні до вентральної; h_1 – ширина голівки стегнової кістки – відстань від її каудальної поверхні до вентральної.

Результати дослідження та їх обговорення

Як відомо, пояс тазової кінцівки у птахів, представлений тазовою кісткою, яка утворена клубовою, лобковою та сідничою кістками. Кістки тазового поясу злилися в одну безіменну кістку, яка служить для прикріплення задніх вільних кінцівок, м'язів і захищають внутрішні органи від ушкоджень.

Досліджені представники ряду лелекоподібних (*Ordo Ciconiiformes*) є довгоногими та виключно пальце-

ходячими птахами, які відмінно та швидко ходять. Під час дослідження макробудови тазової кістки (*os coxae*) та прооксимального епіфіза стегнової виявили спільні ознаки, але і знайшли певні відмінності (рис. 2 – 4).

Для представників ряду лелекоподібних (*Ordo Ciconiiformes*) звуження у середній частині преацетабулярного відділу клубової кістки (*ala preacetabularis ilii*) щодо її краніального відділу характерно для всіх досліджених видів, окрім чаплі сірої, чаплі рудої та квакви звичайної. У них звуження продовжується як у преа- (*ala preacetabularis ilii*), так і у постацетабулярному відділах клубової кістки (*ala postacetabularis ilii*). Заслуговує уваги форма переходу від дорсального гребеня (*crista iliaca dorsalis*) у дорсо-латеральний (*crista iliaca dorso-lateralis*). Для представників ряду лелекоподібних (*Ordo Ciconiiformes*) характерний перехід з добре вираженим виступом, у якого увігнутість злегка опукла.

Суглобова западина (*acetabulum*) являє собою кісткову півсферу, що порівняно глибока щодо розміру кісток, які формують тазостегновий суглоб. У досліджених нами птахів відрізняються суглобові западини (кругла, овальна, поперечно-овальна форма) і фіксація в ній голівки стегнової кістки. Сідничі отвори (*foramen ishiadicus*) відповідно різної величини, у середині них фіксується сідничо-стегнова зв'язка.

Зверху над суглобовою западиною є сформований відросток, що містить виражену суглобову поверхню. Це, так званий, противертлюг (*antitrochanter*), що вступає за відведення стегна в контакт з проксимальним кінцем стегнової кістки. Досліджені птахи відрізняються між

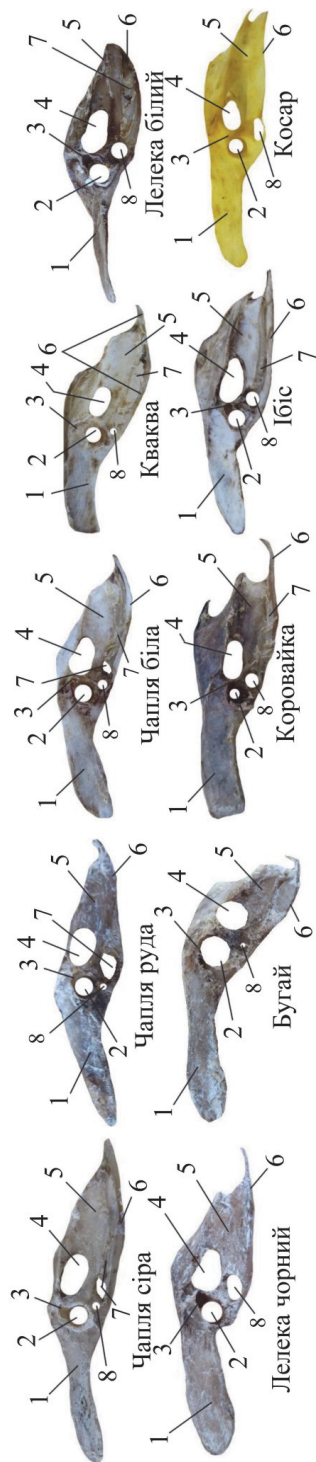


Рис. 2. Форма та розміри тазової кістки (вид з лагєральної поверхні) у досліджєних *Ordo Ciconiiformes*:
1 – клубова кістка; 2 – суглобова ямка; 3 – противєртлюг; 4 – сідниччий отвір; 5 – сідничча кістка; 6 – лобкова кістка;
7 – сідниччо-лобкове вікно; 8 – затульний отвір



Рис. 3. Форма та розміри тазової кістки (вид з дорсальної поверхні) у досліджєних *Ordo Ciconiiformes*:
1 – чопля сіра; 2 – чопля біла; 3 – чопля біла; 4 – чопля біла; 5 – чопля біла; 6 – лелека білий; 7 – бугай;
8 – коровайка; 9 – ібіс; 10 – косар

собою ступенем розвитку противертлюга (*antitrohanter*), насамперед, величиною його виступу в латеральному і дорсо-каудальному напрямках, а також відносною площею відповідної суглобової поверхні. Найбільш розвинений виступ противертлюга відмічається у квакви звичайної, лелеки білого, лелеки чорного, бугая великого, у решти – порівняно менший. Ступінь розвитку противертлюга під час локомоції певною мірою визначає ступінь величини амплітуди рухів у тазостегновому суглобі.

Примітивна форма і ступінь розвитку сідничої кістки (*os ischii*) у представників ряду лелекоподібних (*Ordo Ciconiiformes*). У всіх досліджених птахів вона видовжена та розширена вентро-проксимально. З розвитком сідничої кістки пов'язана форма вікна між сідничою та лобковою кістками та наявність між ними сухожильної мембрани. В усіх досліджених видів сідничо-лобкове вікно (*fenestra ischio-pubica*) довге та вузьке, простір його заміщує сухожильна мембрана. Лише у косаря лобкова та сідничка кістки зрощені між собою, тому сідничо-лобкове вікно не виражене взагалі. Лобкова кістка (*os pubis*) най-

менш розвинена у чаплі сірої, чаплі рудої, бугая великого та косаря, у решти вона більш видовжена відносно довжини сідничої кістки каудально, найдовша вона у чорного ібіса.

Проксимальний епіфіз стегнової кістки у представлених видів ряду лелекоподібних (*Ordo Ciconiiformes*) має певні відмінності. Голівка стегнової кістки (*caput ossis femoris*) кругла, добре виражена, на її дорсо-медіальній поверхні присутня ямка голівки стегнової кістки (*fovea ossis femoris*), на якій фіксується зв'язка голівки стегнової кістки (*ligamentum caput ossis femoris*). Шийка стегнової кістки (*collum ossis femoris*) широка, але коротка. Вертлюг та вертлужна ямка майже не виражені. Лише у лелеки чорного, чорного ібіса та косаря вони добре виражені та спрямовані медіо-дорсально, затульне втиснення відсутнє. На латеральній поверхні стегнової кістки проксимальний її край дещо приплюснутий та загнутий медіально.

За розробленою нами схемою проведеної остеометричні дослідження кіст тазової кістки та проксимального епіфіза стегнової у *Ordo Ciconiiformes*, що оброблені статистично (табл. 1). Виходячи з цих даних можна сказати,



Рис. 4. Форма та розміри проксимального епіфіза стегнової кістки (вигляд з дорсальної поверхні) у досліджених *Ordo Ciconiiformes*

1. Співвідношення структур тазової кістки та проксимального епіфіза стегнової у деяких лелекоподібних, %

Ряд Лелекоподібні Ordo Ciconiiformes															
№ п/п	ид птаха	Кіль- кість ек- земп- лярів	Зна- чення	L1* : L**	L1 : L2	L1 : L3	L3 : L	L2 : L3	a : L3	d1 : d	b1 : b	c1 : c	h1 : h	h : b	h1 : b1
1	Чапля сіра	3	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			14,0	88,4	103,1	13,4	117,3	34,1	70,0	57,7	137,2	100,0	42,4	75,7	
2	Чапля руда	2	M ± m	14,0 ± 0,1	88,4 ± 0,2	103,1 ± 0,1	13,4 ± 0,2	117,3 ± 0,4	34,1 ± 0,5	70,0 ± 0,4	57,7 ± 0,3	137,2 ± 0,4	100,0 ± 0,6	42,4 ± 0,5	75,7 ± 0,3
			M	19,8	105,4	117,3	16,1	110,7	36,3	69,7	60,9	110,7	105,1	51,9	88,7
3	Чапля біла, або чепура велика	3	M ± m	19,8 ± 0,6	105,4 ± 0,8	117,3 ± 0,8	16,1 ± 0,9	110,7 ± 0,4	36,3 ± 0,4	69,7 ± 0,2	60,9 ± 0,4	110,7 ± 0,5	105,1 ± 0,1	51,9 ± 0,1	88,7 ± 1,0
			M	12,2	81,1	90,8	14,4	112,2	44,3	60,6	67,3	109,6	111,0	51,8	83,7
4	Квак	1	M ± m	12,2 ± 0,2	81,1 ± 0,1	90,8 ± 0,3	14,4 ± 0,2	112,2 ± 0,3	44,3 ± 0,4	60,6 ± 0,3	67,3 ± 0,5	109,6 ± 0,2	111,0 ± 0,1	51,8 ± 0,3	83,7 ± 0,1
			M	19,7	93,2	132,2	14,9	141,9	68,0	58,6	71,1	79,7	102,0	55,6	79,7
5	Лелека білий	5	M	14,8	76,0	98,1	14,7	129,8	40,1	67,7	33,9	61,2	106,7	44,6	143,8
			M ± m	14,8 ± 0,3	76,0 ± 0,3	98,1 ± 0,2	14,7 ± 0,2	129,8 ± 0,3	40,1 ± 0,2	67,7 ± 0,2	33,9 ± 0,3	61,2 ± 0,3	106,7 ± 0,3	44,6 ± 0,2	143,8 ± 0,2
6	Лелека чорний	1	M	14,6	63,3	100,0	14,6	157,9	44,2	68,6	62,5	87,5	142,9	43,8	100,0

7	Бугай	1	M	23,6	104,9	104,9	21,4	105,2	31,2	64,6	67,2	-	60,0	82,0	73,2
8	Коровайка	3	M ± m	16,2 ± 0,3	61,6 ± 0,6	73,6 ± 0,3	22,0 ± 0,1	119,3 ± 0,5	56,1 ± 0,1	111,7 ± 0,3	68,1 ± 0,4	107,5 ± 0,5	249,3 ± 0,3	37,0 ± 0,3	131,6 ± 0,8
9	Чорний ібіс	3	M ± m	20,0 ± 0,5	54,6 ± 0,2	66,4 ± 0,4	29,7 ± 0,5	119,2 ± 0,6	25,6 ± 0,5	53,0 ± 0,3	76,2 ± 0,4	78,1 ± 0,4	124,5 ± 0,5	36,8 ± 0,6	60,7 ± 0,3
10	Косар	2	M ± m	35,3 ± 0,5	75,0 ± 0,1	76,4 ± 0,3	45,4 ± 0,2	102,1 ± 0,1	45,2 ± 0,4	63,1 ± 0,4	52,7 ± 0,2	114,9 ± 0,1	104,6 ± 0,3	41,7 ± 0,2	81,8 ± 0,2

Примітка: *L – довжина тазової кінцівки – відстань від проксимального кінця вертлюга стегнової кістки до кінця кігтя середнього пальця; **L1 – довжина стегнової кістки – відстань від проксимального кінця вертлюга стегнової кістки до латерального виростка дистального кінця стегнової кістки; L2 – найбільша довжина тазового поясу – відстань від краніальної дугої клубової кістки до каудальної поверхні лобкової; L3 – найменша довжина тазового поясу – відстань від краніальної дугої клубової кістки до каудальної поверхні сідничої; а – ширина тазу – відстань між латеральними краями противертлюгів лівої та правої тазових кісток; b – висота суглобової западини – відстань від дорсальної поверхні протитвертлюга до вентральної дугої суглобової западини; b1 – ширина суглобової западини – відстань від краніальної поверхні суглобової западини до каудальної; с – ширина суглобового отвору – відстань від краніальної поверхні суглобового отвору до каудальної; с1 – висота суглобового отвору – відстань від дорсальної поверхні суглобового отвору до вентральної; d – ширина кінця стегнової кістки на рівні її голівки – відстань від латеральної поверхні проксимального епіфіза стегнової кістки до медіальної поверхні голівки стегнової кістки; d1 – ширина стегнової голівки під вертлюгом – ширина проксимального діяфіза стегнової кістки; h – висота голівки стегнової кістки – відстань від її дорсальної поверхні до вентральної; h1 – ширина голівки стегнової кістки – відстань від її каудальної поверхні до вентральної.

що довжини кінцівки щодо довжини *os femoris* найменш розвинена у *Ardea alba* (12,2 %), а найбільш – у *Platalea leucorodia* (35,3 %).

Щодо співвідношення *os femoris* до найбільшої довжини тазового поясу (відстань від краніальної дуги *os illii* до каудальної поверхні *os pubis*) та до найменшої (відстань від краніальної дуги *os illii* до каудальної поверхні *os ichii*), то найменші вони у *Geronticus calvus* (54,6 та 66,4 %), а у *Ardea purpurea os femoris* дещо менша за найбільшу та найменшу довжину тазового поясу – 105,4 та 117,3 % відповідно. Співвідношення найменшої довжини тазового поясу до довжини кінцівки, то цей показник коливається від 13,4 (*Ardea cinerea*) до 45,4 % (*Platalea leucorodia*). Показник співвідношення найбільшої довжини тазу до найменшої, то у відповідно найменший показник у *Platalea leucorodia* (102,1 %), а найбільший – у *Ciconia nigra* (157,9 %). Серед досліджених *Ciconiiformes* показник найменшої довжини тазу до його ширини у більшості коливається від 34,1 до 68,0 %.

Щодо показника співвідношення ширини *os femoris* на рівні її голівки до ширини *os femoris* під вертлюгом, то у *Ciconiiformes* він коливається від 53,0 (*Geronticus calvus*) до 111,7 % (*Plegadis falcinellus*). Форма *acetabulum* у всіх досліджених *Ciconiiformes* поперечно-овальної форми (33,9 – 76,2 %). Форма *foramen acetabulum* серед *Ciconiiformes* у більшості овальної форми (107,5 – 137,2 %), але зустрічаються і поперечно-овальної з показником від 61,2 до 87,5 %. Щодо *caput ossis femoris*, то у досліджених *Ciconiiformes* має свої особливості. Так у *Ardea cinerea* вона овальної форми – 100,0 %. У *Botaurus stellaris* овальної – 60,0 %, у решти поперечно-оваль-

ної форми від 102,0 до 249,3 %. Щодо співвідношення висоти *acetabulum* до висоти *caput ossis femoris*, то майже в усіх *Ciconiiformes caput ossis femoris* входить *acetabulum* та вільно розміщується в ній, показник співвідношення коливається від 36,8 до 82,0 %, надаючи вільні рухові можливості тазовій кінцівці. Аналогічно можна сказати про результат, що дає співвідношення ширини *acetabulum* до ширини *caput ossis femoris* (60,7 – 88,7 %). Незважаючи на це, лише в *Ciconia ciconia*, *Ciconia nigra*, *Plegadis falcinellus* цей показник вище 100,0 %. Це свідчить про те, що *caput ossis femoris* щільно та вузько заходить в *acetabulum* та не надає вільних рухових можливостей.

Висновки і перспективи

Як відомо, скелет птаха має виконувати більш жорстку роботу, ніж скелет ссавців. Він повинен бути достатньо легким для польоту, але також достатньо міцним, щоб пережити напружену польоту та переміщення під час локомоції. Для вирішення цих проблем скелети птахів мають деякі унікальні пристосування. Тому скелетні системи птахів мусять модифікуватися відповідно до їх використання.

Відмінність форми та відносних розмірів тазової кістки та проксимального епіфіза стегнової у досліджених видів птахів, обумовлені типом опори, способом біпедальної локомоції та дією функціональних навантажень на ту чи іншу із зазначених ділянок. Осифікація певних структур, наявність затульного втиснення чи вертлужної ямки, виникає під час дії функціональних навантажень та під час маніпуляційних рухів. Форма та розмір тазу, прямопропорційно залежить від форми та розміру яйця.

У перспективі досліджень закладено детальний порівняльно-анатомічний опис скелетних елементів локомоторного апарату птахів, що дасть можливість зрозуміти процес їх формування та розвитку під дією різних зовнішніх чинників. Виявлення особливостей скелетних елементів птахів на широкому порівняльно-анатомічному матеріалі, встановлення відмінності форми та розмірів кісток, що формують суглоб, різний ступінь вираженості сіднично-лобкового вікна, осифікація суглобового отвору, форма та розмір сідничного отвору, а також утворення затульного втиснення дозволять зробити вагомий внесок у вирішення проблем взаємозв'язку між формою, структурою і функцією та дають змогу виявити закономірності становлення і розвитку тазостегнового суглоба птахів.

References

- Akaevsky, N. I. (1972). Some fragments from the muscles of the leg of a chicken and a duck. Report of the All-Union Conference on Anatomy, Histology, Embryology. Animals, Moscow, 36.
- Bannasch, R. (1986). Morphologico-functional study of the locomotor system of penguins as a principle of the general motor model of underwater flight. II. Gegenbaurs Morphol. Jahrb., 132 (6): 757–817.
- Baumel, J. J., King, A. S. & Lucas, A. M. (1979). Nomina Anatomica Avium [Nomina Anatomica Avium]. London: Acad. Press., 637.
- Berman, S. L. & Raikow, R. J. (1982). The hind-limb musculature of the mousebirds (Coliiformes). Auk., 99(1): 41–57.
- Bogdanovich, I. A. (2004). Interspecific allometry of locomotor muscles of birds. Journal of Zoology, 38 (4):83–86.
- Bogdanovich, I. A. (2011). Peculiarities of the shape of cross sections of long bones of the pelvic limb in birds. Journal of Zoology, 45 (3): 259–264.
- Cracraft, J. & Clarke, J. (2001). The basal clades of modern birds. New perspectives on the origin and early evolution of birds. Special Publ. Peabody Mus. Nat. Hist. New Haven, Conn., USA: Yale Univ, 143–56.
- Druz, N. V. & Savchuk, K. O. (2017). Biomorphological features of bones of hip joint that act on it in some representatives of the order gruiformes – Ordo Gruiformes. Bulletin of NULES of Ukraine, 265:112–116.
- Druz, N. V. & Zaloyilo, E. I. (2017). Specific features of the iliac muscle of predatory birds. Bulletin of NULES of Ukraine, 285: 101–108.
- Druz, N. V. & Melnyk, O. P. (2012). Biomorphology of the hip joint of some storks. Scientific works of PFNUBiPU KAU, 144: 40–46.
- Fürbringer, M. (1888). Untersuchungen zur Morphologie und Systematik der Vögel [Doslidzhennya z morfolohiyi ta systematyky ptakhiv]. Amsterdam, Jena, 1751.
- Fürbringer, M. (1902). Zur vergleichenden Anatomie des Brustschulterapparates und der Schultermuskeln. Z. Naturwiss., 36:289–736.
- Gadow, H. & Selenka, E. (1891). Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs. Anatomischer Theil [Klasy Bronna i porjadky tvarynnoho tsarstva. Anatomichna chastyna]. Leipzig, 1(6): 10 – 1008.
- Kurochkin, E. N. (1971). Adaptive features of the structure and locomotion of water birds. The results of science. Vertebrate zoology. Moscow. BLAME, 94–135.
- Loparev, S. A. (1996). Possible adaptive value of the open pelvis of birds and a new hypothesis of the origin of flight. Ukrainian ornithological journal "Berkut", 5(2): 216–230.
- Maurer, D. R. (1977). The appendicular myology and relationships of the avian order Coraciiformes. Unpubl., Ph. D. diss. Pittsburgh, Pennsylvania: Univ. Pittsburgh, 347.
- Melnyk, O. P. & Druz, N. V. (2012). Analysis of biomorphological features of the hip joint of some storks. Scientific Bulletin of PDAA, 4: 90–94.

- Shatkovska, V., Ghazali, M., Mytiai, I. S. & Druz, N. (2018). Size and shape correlation of birds' pelvis and egg: Impact of developmental mode, habitat, and phylogeny. *Journal of Morphology*, 20 – 28.
- Zinoviev, A. B. (2007). Comparative anatomy, structural transformations and adaptive evolution of the apparatus of two-legged locomotion of birds: author's ref. dis. ... Dr. biol. Sciences: specialty 03.00.08 - "Zoology". Moscow: Moscow State University, 53.
-

Druz N. V. (2020). MORPHO-METRIC DESCRIPTION OF THE PELVIC BONE AND PROXIMAL FEMUR EPHYPHYSIS OF STORKFORMES. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 11(2): 20–30, <https://doi.org/10.31548/ujvs2020.02.002>.

Abstract. *The pelvic bone and the proximal epyphysis of the femur bone are the main supporting components of the hip joint, and this is the leading link of the free pelvic limb, which gives it considerable mobility, determines its position in static and locomotion. In the evolution process, these components acquire the value of a kind of central shock absorber against shocks, which gets the moving limb. On the basis of comparative anatomical analysis, the peculiarities of skeletal elements of the pelvic bone and the proximal femoral epyphysis of some storks are presented, as the main elements of the pelvic limb as a whole. It was determined, that the morpho-metric features of the skeletal elements of the studied birds caused by specific bipedalism, which is based on position of the axis of the body relatively to the pelvic limbs and maintain the body between two limbs.*

It was determined that the investigated structural elements differ in shape and size. Also, it was determined, that among the investigated storks the shortest femur in relation to the total length of the limb of the white heron is 12.1 ± 0.2 . The longest femur relatively to the total length of the limb of the moor is 35.3 ± 0.5 . These indicate that the short femur is characteristic for birds that are maximally adapted to water locomotion and most likely it is caused by the need to press the pelvic limb tightly to the trunk in the thigh area in the process of swimming. The longer femur provides more distal fixation points for the deep femur, cranial iliac and caudal muscles while increasing their flexural and extensor function with respect to the thigh. Among the studied Ciconiiformes, the index of the smallest pelvic length to its width ranges from 31.2 to 68.0 %. This indicates that the wider is the pelvis, the larger eggs can lay a female of this species.

Keywords: *pelvic bone, femur, a number of storks, gray heron, moor heron, white heron, common quack, white stork, moor, ibis, moor*

Подано до друку 1 травня 2020 року

PREVENTION OF MINERAL METABOLISM DISORDERS IN FATTENING RABBITS

Yu. V. KORNIICHUK, PhD student* of the Department of Therapy
and Clinical diagnosis, Faculty of Veterinary Medicine,
<https://orcid.org/0000-0003-3323-1510>

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
E-mail: lisa8919@bigmir.net

Abstract. *The main reason for the weakening of the body of rabbits is a deficiency of nutrients and biologically active substances in their diet. The search for non-toxic and highly effective preventive drugs of complex action that have a positive effect on the metabolism of minerals in rabbits is of keen interest. Here we present the results of the study of morphological and biochemical parameters of the blood as well as the content of chemical elements in blood plasma in New Zealand White rabbits on the farm in Kyiv region. The paper presents the materials for determining the biochemical status of the body in fattening rabbits for the prevention of microelementoses using a new experimental environmentally friendly tool. The content of total protein, albumin, glucose, total calcium, inorganic phosphorus, total bilirubin, urea, creatinine, TBA-active products, Fe, Mn, Cu, Zn, Co and the activity of ALT, AST, LF, and HGT in the blood of New Zealand White rabbits in the first and 50th days of the experiment (before and after the use of biologically active additive "Huminorm plus") are presented here for the first time. The use of this additive had a positive effect on haematopoiesis, protein and mineral metabolism, and functional status of the liver, which indicates its high efficiency for the prevention of micronutrient deficiency. "Huminorm Plus" stimulates potential body growth in rabbits up to the age of 90 days.*

Keywords: *biochemical parameters, trace elements, TBA-active products, blood, biologically active additive, New Zealand White rabbits*

Introduction

Rabbit breeding is widespread throughout the world. Modern industrial rabbit breeding involves the slaughter of rabbits in an average of three months, by which time rabbits should gain about 2.5 kg of live weight. Although rabbits

are usually considered as fast-growing animals, such results can only be achieved under the conditions of a complete and balanced diet including all the necessary components, in particular mineral complexes. The micronutrient deficiency caused by an impact of environmental changes and technogenic factors

*Scientific supervisor – D.Vet.Sci., associated professor N. G. Grushanska

requires the development of complex biologically active additives for specific areas and provinces. The deficiency of mineral elements has a large economic loss due to mass diseases and death of animals arising from metabolic disorders, especially in late winter and early spring period of keeping. This is mostly due to the disproportion of basic nutrients and biologically active substances, in particular macro- and micronutrients, in the diet of rabbits (Fedak et al., 2012).

Analysis of recent researches and publications

Up to three months of age, rabbits need food additives comprising trace elements such as Calcium, Phosphorus, Ferrum, Zinc and Cuprum. This need for micronutrients is constantly increasing from birth with increasing of animal body size, lung and heart volume (Vorobiev & Ulihina, 2007).

Kuzmenko et al. (2019) found that the optimal dose of Cuprum in chelate form in the diet of juvenile rabbits is 3.91 g/t of feed; it covers the deficiency in this element by 50 %. Feeding of juvenile individuals with the compound feed containing Cu chelate increases their live weight by 8.7 % and reduces feed costs for growth by 2.9 % (Kuzmenko et al., 2019). Udris (1966), Nikolsky (1968) and Romanchuk & Annamuhamedova (2002) pointed out that Cu, Mn, Zn, Fe-comprising enzymes play an important role in immunogenesis of animal organism to infectious diseases.

The importance of Zinc for the growth and development of the animal body was proven for the first time by Todd (1934) on rats. The role of this element is determined by its participation in the functioning of the genetic apparatus and cell division processes through

the synthesis of protein and nucleic acids. Zinc plays an important role in skeletal formation. Its deficiency causes an inhibition of alkaline phosphatase in chondrocytes of epiphyseal cartilage, which is a major biochemical defect in bone development according to Henning (1976). Zinc is also involved in processes of bone calcification (Lemesheva & Jurchenko, 2009).

Cobalt as a component of vitamin B₁₂ impacts on haematopoiesis and digestion. The addition of 0.5 mg Co to the diet had a positive effect on the growth and development of juveniles and their slaughter qualities (Fedoruk & Lesyk, 2009).

Mangan actively involved in redox processes and tissue respiration in animals, bone formation and synthesis of cartilage, affects the growth of juveniles, regulates endocrine function, enhances the action of vitamins being included into enzymes as their activator. Mangan stimulates protein synthesis in muscles and glycogen in the liver, promotes the Mg-ATPase activity which increases live weight (Pedan, 2013).

Insufficient Mn intake causes anaemia and rickets (Pedan, 2013). Mangan together with Ferrum, Cuprum and Cobalt stimulate haematopoiesis (Pedan, 2013).

Ahmadi et al. (2007) studied the impact of toxic doses of Ferrum (Fe²⁺) on mineral status of the blood serum of rabbits. The results showed that the intra-peritoneal introduction of 10 mg/kg Fe²⁺ leads to increased levels of K, Mg, Fe and Ca, and also reduces the concentration of Na and Cl in the blood serum of rabbits with a balanced diet (Ahmadi et al., 2019). Fe in biotic doses accelerates the animal growth, tissue healing, and enhances liver regeneration (Bogoslovskaja et al., 2007). Fe, Cu, Zn, Mn and Co belong to essential micronutrients, and their absence or insufficient

dose in the diet caused a slowdown in animal body growth (Pedan, 2013).

Humic acids are widely used in animal husbandry, poultry and fish farming. New research on the effectiveness of their use and dosage in rabbit breeding is recently relevant. Willis (2015) found the effectiveness of using humic acids for better absorption of minerals in the intestines of mice. Salama et al. (2019) in their studies with the addition of 0.2 % humic acid to the diet of rabbits found an improvement in feed intake and final body weight, as well as a reduction in the mortality rate of animals. In addition, humic acid in the presence of ochratoxin-A (OTA) improves the function of liver and kidneys, reducing pathological changes in these organs and restoring the antioxidant status of the body (Salama et al., 2019).

Minerals with the adsorbent properties within complex substances and dietary additives are widely used in animal husbandry and veterinary medicine (Willis, 2015; Filipova et al., 2019). It is showed a positive sorbent effect of glauconite accumulating in the gastrointestinal tract of animals for 3–4 days. This mineral promotes better Cu absorption and does not cause calcium loss (Filipova et al., 2019).

Succinic acid is an important component in the products of cellulose fermentation. Its addition to the diet of rabbits has a positive effect on feed digestibility (Hall, 1952). Zadnypriany et al. (2019) found that succinic acid in combination with inosine acting as high-energy phosphate supply by maintaining adenosine triphosphate at levels sufficient for supporting the contractile function of the myocardium. Raafat (2011) showed the efficiency of di-mercapto-succinic acid (DMSA) to reduce the concentration of Pb ions in the blood, liver, kidneys and brain in the case of lead

toxicity of the body of rabbits. The use of complex drugs for the prevention of mineral disorders in rabbits is the most effective. Mista et al. (2012) studied the effect of humic-fatty acids (HFA) on production parameters and quality of rabbit meat. The HFA consists of 80 % humic-mineral components (Si, Al, Fe, Ca, Na, Mg, P, Mn, Zn, Cu, K, Co, Se) and 20 % vegetable oil (oleic, linoleic, linolenic, palmitic acids). The results of studies indicate a tendency to increase body weight, improve the quality of rabbit meat and increase the content of Fe (Mista et al., 2012).

Fedorchenko (2016) reported positive changes in the antioxidant system of rabbits after adding of mineral additive including K, P, Na, Ca, Cu, Zn, Mn, Fe, I, Co, Se, and vitamins A, D₃, E, K₃, B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₁₂ to their diet.

Thus, the use of dietary additives including glauconite, humic acid salts, succinic acid and trace elements is a promising research area.

The aim of the study is to determine the impact of complex biologically active additive on organism of fattening rabbits for the prevention of microelementoses.

Materials and methods of research

Research was conducted at the company “Antonov-agro” (Kyiv region). The diet of rabbits for fattening is balanced according to the main indicators, water supply is centralized, watering from automatic drinking bowls.

New Zealand White rabbits aged 60 days, weighing 1.341 ± 0.084 kg were divided into two groups: 10 individuals in the experimental group and seven individuals – in the control one. These groups were kept in two separate cages.

Animals from the control group received pellet feed of 0.155 kg per animal per day up to 90 days of age and 0.175 kg per animal per day from the 91th day until the end of the study, with free access to drinking water. The feed mixture included (g/kg): lucerne hay 265, wheat 140, sunflower meal 110, barley 309, oats 100, soybean meal 58, Lumantse C 1, chalk 4, premix "FYS" 4.5 (650 g calcium carbonate, 100 g saraponin, 250 g oligosaccharide in 1 kg of the premix), Clinofid 2 (neutralizer of mycotoxins based on clinoptilol and heulandite), tricalcium phosphate 4, salt 1.5, lysine 1. In the experimental group, rabbits were given in addition to the basic ration biologically active additive "Huminorm plus" – 4 g per 1 kg of feed daily, during 50 days. This additive included glauconite, succinic acid, sodium salts of humic and fulvic acids, as well as Zn, Mn, Cu, Co and Fe lactates. The daily dose of trace elements in this additive per one animal was the following (up to 90 days of age and from the 91th day, respectively): Zn – 28.7 and 32.4 mg, Mn – 5.7 and 6.5 mg, Cu – 5.7 and 6.5 mg, Co – 0.12 and 0.13 mg, Fe – 28.7 and 32.4 mg.

Blood in fattening rabbits was sampled from the marginal ear vein in a disposable test tubes after preliminary clinical examination of animals, early in the morning before feed. Heparin-stabilized blood was transported and stored at 4 °C. Morphological and biochemical studies, antioxidant status and element composition of blood samples were carried on the first and fiftieth day. Control weighing of animals was performed in the morning before feed on the first, fourteenth, thirtieth, fortieth and fiftieth day to determine the weight gain.

All manipulations with animals were carried out in accordance with the European Convention for the protection and

vertebrate animals used for experimental and scientific purposes (2006) and General ethical principles of animal experiments adopted by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, Ukraine, 2001).

The clinical analysis of blood included the counting of the number of erythrocytes and leucocytes in the chamber with Goriaev's grid under the MicroMed XS 3320 microscope, determination of haemoglobin content (haemoglobin cyanide method with acetone cyanohydrin) and the average content of haemoglobin in erythrocytes; derivation of the leukogram by the calculation method according to Filipchenko. Blood smears were stained with a set of Leykodif 200 (LDF 200).

The concentration of total protein, albumin, glucose, total calcium and inorganic phosphorus was determined by colorimetry, while the activity of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (g-GT) was estimated by the kinetic method. The study was performed on a semi-automatic biochemical analyser "Labline – 010".

TBA-active products in red blood cells were determined by the Jagi's method modified by Ishihara & Goncharenko (1985), catalase activity in blood serum was estimated using the SF-26 spectrophotometer according to Koroliuk (1988).

The content of chemical elements in blood plasma was determined by the method of atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma on the device Optima 2100 DV Perkin Elmer. All digital data obtained during the study were processed statistically using Microsoft EXCEL. Student's criterion was used to determine the probability of differences between mean values.

Results of the research and their discussion

Clinical parameters of rabbits during the fattening were within the range of physiological fluctuations. The morphological composition of the blood of animals of both groups on the first day of the experiment did not exceed physiological limits, however the haemoglobin content, the number of erythrocytes and the average hemoglobin content in erythrocytes

approached the lower physiological limit (Table 1). A reliable increase of haemoglobin content (in 1.1 times) and a tendency to increase the number of erythrocytes and average haemoglobin content was observed after the use of biologically active additive "Huminorm plus" (50th day) in the blood of animals from the experimental group compared with rabbits in the control group (Table 1). Other morphological parameters of the blood of rabbits also do not go beyond the physiological limits.

1. Morphological parameters and haemoglobin content in the blood of New Zealand White rabbits with prevented microelementosis during fattening,

$M \pm m, n = 5$

Parameter	Reference interval [°]	Duration of the study, day			
		1		50	
Group of animals		control	experimental	control	experimental
RBCs, $\times 10^6/\mu\text{L}$ (T/L)	5.30 – 6.24	5.47 ± 0.09	5.83 ± 0.15	5.76 ± 0.14	6.04 ± 0.06
Lim _{min} - max		5.34 – 5.62	5.58 – 6.18	5.43 – 6.18	5.88 – 6.20
Hb, g/L	112 – 134	111 ± 3	115 ± 4	112 ± 4	$128 \pm 2^{**}$
Lim _{min} - max		105 – 115	108 – 123	106 – 123	124 – 134
MCH, pg	21.0 – 21.5	20.3 ± 0.9	19.8 ± 1.1	19.4 ± 0.6	21.2 ± 0.1
Lim _{min} - max		18.7 – 21.1	18.0 – 20.8	17.5 – 20.8	20.9 – 21.6
WBCs, $\times 10^3/\mu\text{L}$ (G/L)	7.7 – 9.1	8.01 ± 0.20	8.0 ± 0.1	7.2 ± 0.7	8.3 ± 0.4
Lim _{min} - max		7.7 – 8.4	7.8 – 8.2	5.7 – 9.2	6.9 – 8.9
Basophils, %	0.8 – 3.1	1.3 ± 0.4	1.7 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2
Lim _{min} - max		1 – 2	1 – 2	0 – 1	1 – 2
Eosinophils, %	0.9 – 1.6	1.3 ± 0.4	1.7 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2
Lim _{min} - max		1 – 2	1 – 2	1 – 2	1 – 2
Neutrophils (Heterophils), %	25.0 – 35.9	32.7 ± 1.0	30.3 ± 2.5	32.8 ± 0.9	28.4 ± 2.1
Lim _{min} - max		31 – 34	26 – 33	30 – 35	24 – 34
Lymphocytes, %	60.0 – 67.5	61.7 ± 1.4	63.0 ± 1.7	63.2 ± 1.0	65.8 ± 1.7
Lim _{min} - max		60 – 64	61 – 66	62 – 67	61 – 69
Monocytes, %	1.4 – 5.6	3.0 ± 0.6	3.3 ± 0.9	3.8 ± 0.5	3.4 ± 0.6
Lim _{min} - max		2 – 5	2 – 5	2 – 5	2 – 5

Note: * Jain, (1986). *Schalm's veterinary haematology*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 1221; Sanderson & Phillips, (1981). *An Atlas of Laboratory Animal Haematology*. Oxford University Press, Oxford, p. 473; ** $P < 0.01$ as compared with animals of the control group.

Values in the leucogram of rabbits of both groups during the fattening do not go beyond the physiological limits (Table 1). On the 50th day of the experiment, the percentage of neutrophils in the leucogram of rabbits in the experimental group slightly decreased due to an increase in the percentage of lymphocytes compared to the corresponding values on the first day. Hematopoietic processes are positively influenced by such trace elements as Co, Cu, Mn, Fe (Fedoruk & Lesyk, 2009; Pedan, 2013). According to Kowalska (1959), anaemia caused by the deficiency of these elements, manifested in the decrease of total protein, reserve alkalinity, the number of erythrocytes and haemoglobin (Romanchuk & Annamuhamedova, 2002). Therefore, the use of the biologically active additive "Huminorm plus" had a positive effect on the haematopoiesis of experimental animals.

Biochemical parameters do not go beyond the physiological limits in blood serum of rabbits of both groups on the first day of experiment, but the content of total protein and albumin approached the lower physiological limits (Table 2). The concentration of the total protein, albumin, total calcium, urea and creatinine is reliably higher in blood serum of rabbits from the experimental group after the use of "Huminorm plus" (50th day) 1.1, 1.1, 1.2, 1.7, and 1.3 times, respectively. At the same time, concentrations of inorganic phosphorus and g-GT were lower (1.2 and 1.8 times, respectively) compared with those in animals of the control group.

The formation of urea and creatinine in the body increases with increasing of protein catabolism, and its decrease – with insufficient intake with the food. Increasing concentrations of urea and creatinine may also indicate kidney disease and urinary system pathology, when their values go beyond physiological limits.

So, such an increase in the blood serum of rabbits of the experimental group can be explained by the presence humic substances in the composition of dietary additives. These substances are a mixture of natural organic macromolecular compounds (biochemical transformation of organic products into humus). An increase of urea and creatinine in the blood serum of could be due to the high degree of assimilation of humic acids.

An increase of total calcium content and the decrease of inorganic phosphorus allow us assuming the processes stimulating calcium metabolism and more intensive assimilation of phosphorus. It is manifested in growth acceleration and weight gain.

Increased total protein and albumin in the blood of rabbits of the experimental group indicates stimulation of protein metabolism in their body. The decrease of g-GT activity in the blood of these animals confirms the absence of harmful effects of biologically active additives on liver cells, and conversely, the physiological state of the liver has improved with the use of dietary additives.

Alkaline phosphatase activity did not change significantly during the experiment. The total activity of alkaline phosphatase in the blood of healthy animals consists of the activity of bone, liver and intestinal isoenzymes. It is insufficient to diagnose liver pathology by changes in alkaline phosphatase activity; it is also necessary to take into account the activity of g-GT, AST, and ALT as well as the concentration of total bilirubin. In growing animals, alkaline phosphatase activity may be increased, which will not be a sign of a pathological condition. Therefore, the use of the biologically active additive "Huminorm plus" has a positive effect on the metabolism of protein, calcium, phosphorus and the liver function.

2. Biochemical parameters of the blood serum of New Zealand White rabbits, $M \pm m, n = 5$

Parameter	Reference interval [*]	Duration of the study, days			
		1		50	
Group of animals		control	experimental	control	experimental
Protein total, g/L	54 – 75	55.7 ± 0.8	55.9 ± 2.2	54.9 ± 1.1	62.5 ± 1.6**
Lim _{min} - Lim _{max}		54.3 – 57.0	49.4 – 60.4	53.1 – 56.7	58.9 – 66.3
Albumin, g/L	25 – 50	25.9 ± 0.6	26.4 ± 0.4	25.8 ± 0.9	28.1 ± 0.5**
Lim _{min} - Lim _{max}		25.1 – 26.9	24.9 – 27.2	24.3 – 26.9	26.2 – 29.1
Glucose, mmol/L	4.16 – 8.33	5.20 ± 0.17	5.32 ± 0.10	4.41 ± 0.41	5.62 ± 0.17
Lim _{min} - Lim _{max}		4.90 – 5.40	5.03 – 5.72	4.00 – 5.12	5.00 – 5.95
Calcium, mmol/L	2.00 – 3.70	2.56 ± 0.15	2.62 ± 0.16	2.58 ± 0.18	3.20 ± 0.13**
Lim _{min} - Lim _{max}		2.31 – 2.80	2.1 – 2.9	2.35 – 2.89	2.9 – 3.5
Phosphorus, mmol/L	0.74 – 2.23	2.07 ± 0.12	2.09 ± 0.08	2.08 ± 0.09	1.76 ± 0.11**
Lim _{min} - Lim _{max}		1.86 – 2.20	1.90 – 2.25	1.92 – 2.20	1.37 – 2.01
Urea, mmol/L	2.50 – 8.33	2.67 ± 0.10	2.82 ± 0.39	3.33 ± 0.21	5.50 ± 0.83**
Lim _{min} - Lim _{max}		2.50 – 2.80	2.1 – 4.0	3.10 – 3.70	3.0 – 7.1
Creatinine, μmol/L	44.20 – 229.84	149.93 ± 10.76	142.96 ± 11.82	151.97 ± 7.80	199.64 ± 19.33**
Lim _{min} - Lim _{max}		131.4 – 160.1	119.7 – 181.8	139.3 – 165.4	160.8 – 238.3
ALP, IU	4 – 70	35.8 ± 3.2	36.6 ± 3.3	34.8 ± 5.5	37.8 ± 4.2
Lim _{min} - Lim _{max}		30.3 – 40.1	26.0 – 43.34	29.22 – 44.30	27.1 – 48.5
AST, IU	14 – 113	18.1 ± 1.3	20.8 ± 3.5	19.8 ± 4.3	19.6 ± 2.7
Lim _{min} - Lim _{max}		15.9 – 20.1	14.5 – 32.3	12.4 – 27.0	13.5 – 26.1
ALT, IU	14 – 80	38.0 ± 2.9	35.2 ± 7.1	35.0 ± 5.4	25.9 ± 5.2
Lim _{min} - Lim _{max}		35.0 – 43.0	14.4 – 52.3	28.6 – 44.3	14.9 – 38.7
g-GT, IU	0 – 7	6.1 ± 0.6	5.9 ± 0.6	6.7 ± 0.5	3.8 ± 0.6**
Lim _{min} - Lim _{max}		5.1 – 7.2	3.8 – 7.2	5.9 – 7.1	2.1 – 5.7
Bilirubin total, μmol/L	0 – 12.83	6.87 ± 0.99	7.12 ± 0.59	7.20 ± 1.45	6.36 ± 0.65
Lim _{min} - Lim _{max}		5.17 – 8.13	5.8 – 8.3	4.70 – 9.10	5.1 – 8.0

Note: * Carpenter, (2018). Exotic Animal Formulary; ** $P < 0.05$ as compared with animals of the control group.

Similar results were obtained by Chiericato et al (2000) during the study of metabolic, enzymatic and mineral profile of rabbits aged from 36 to 119 days. It was showed that glucose level did not change with the age; total proteins, albumins and globulins, urea and creatinine increased; AST, ALT, LF enzymes do not change, and

g-GT decreased; Ca level increased, while P decreased, and the levels of Mn, Na, K and Cl remained unchanged during the experimental period (Chiericato et al., 2000).

The concentration of elements in blood plasma of rabbits from both groups on the first day of the experiment was in the range of physiological indicators (Table 3).

3. The content of chemical elements in blood plasma of New Zealand White rabbits, $M \pm m$, $n = 5$

Parameter	Duration of the study, days			
	1		50	
Group of animals	control	experimental	control	experimental
Calcium R	95.0 $\pm$ 3.89	96.45 $\pm$ 6.18	112.39 $\pm$ 6.32	268.75 $\pm$ 50.85*
Lim _{min} - max	88.30 – 99.60	87.26 – 107.09	101.52 – 120.14	164.08 – 408.24
Manganese	0.0054 $\pm$ 0.0001	0.0055 $\pm$ 0.0004	0.021 $\pm$ 0.006	0.032 $\pm$ 0.002*
Lim _{min} - max	0.0052 – 0.0056	0.0048 – 0.0062	0.01 – 0.03	0.025 – 0.038
Zinc	4.18 $\pm$ 0.33	4.18 $\pm$ 0.46	4.24 $\pm$ 0.36	6.94 $\pm$ 0.56**
Lim _{min} - max	3.76 – 4.76	3.44 – 4.92	3.63 – 4.84	5.3 – 8.78
Iron	1.43 $\pm$ 0.25	1.48 $\pm$ 0.32	1.84 $\pm$ 0.12	2.60 $\pm$ 0.23*
Lim _{min} - max	1.03 – 1.86	0.96 – 1.99	1.68 – 2.04	1.68 – 3.05
Cobalt	0.005 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.001	0.010 $\pm$ 0.001	0.020 $\pm$ 0.005
Lim _{min} - max	0.004 – 0.007	0.0024 – 0.0072	0.008 – 0.012	0.0073 – 0.027
Cuprum	1.12 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.05	1.16 $\pm$ 0.19	1.85 $\pm$ 0.24*
Lim _{min} - max	1.03 – 1.19	1.03 – 1.20	0.83 – 1.46	1.18 – 2.55

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, as compared with animals of the control group.

A higher content of Ca (2.4 times), Mn (1.5 times), Zn (1.6 times), Fe (1.4 times) and Cu (1.6 times) was recorded on the 50th day of the experiment in the blood of rabbits of the experimental group compared with those of the control group. A slight increase in the concentration of all studied chemical elements was observed in the blood plasma of rabbits of the control group on the 50th day of the experiment. Thus, the use of “Huminorm Plus”

had a positive effect on the metabolism of Calcium, Manganese, Zinc, Ferrum and Copper in rabbits.

Catalase activity in the erythrocytes of rabbits of the experimental group at fattening on the 50th day was 1.6 times lower (Table 4) compared with that of the control group. Catalase lowering the concentration of cytotoxic hydroxyl radicals by the reduction of H_2O_2 . The increase of catalase activity in eryth-

4. The indicators of antioxidant defence system of New Zealand White rabbits, $M \pm m$, $n = 5$

Parameter	Duration of the study, days			
	1		50	
Group of animals	control	experimental	control	experimental
TBA-active products, mmol/L	56.55 $\pm$ 6.72	59.62 $\pm$ 3.69	49.48 $\pm$ 1.04	50.64 $\pm$ 3.69
Lim _{min} - max	44.98 – 66.38	44.87 – 67.31	48.07 – 51.28	38.46 – 60.90
Catalase, mkat/L	7.47 $\pm$ 1.08	7.30 $\pm$ 0.86	11.33 $\pm$ 0.07	7.20 $\pm$ 1.46*
Lim _{min} - max	5.60 – 9.00	5.33 – 9.10	11.21 – 11.43	5.38 – 10.21

rocytes of rabbits of the control group may indicate the peroxide oxidation of lipids (Brechka et al., 2019).

The content of TBA-active products allowing to estimate the state of lipid peroxidation in the body does not significantly changed in the blood serum of rabbits from both groups during the experimental period.

Body weight gain for the first 14 days of the experiment amounted to 28 % in rabbits of the control group, and 36 % – in the individuals of the experimental group (Table 5). Over the next 16 days, an increase of body weight in rabbits of the control and experimental group was equal to 16 % and 37 %, respectively. Weight gain in rabbits of both groups during the next few decades is presented in Table 5.

High weight gain in rabbits of the experimental group was observed up to 90 days, and after there was a significant decrease in growth rate. Rabbits are usually kept up to 90 days, and then transferred for slaughter; therefore, the weight gain of these animals from 60 to 90 days is rather important in terms of industrial husbandry. During this period, the increase in body weight of rabbits of the control group was 45%, while it reached 73 % in individuals of the experimental group. Over the entire period of the experiment, the percentage of body weight gain in rabbits of the control and experimental groups was 87 % and 98%,

respectively. The use of “Huminorm Plus” stimulates potential body growth in rabbits up to the age of 90 days.

Summarizing, the use of “Huminorm plus” for rabbits had a positive effect on haematopoiesis, protein and mineral metabolism, and functional status of the liver, which indicates its high efficiency for the prevention of micronutrient deficiency.

Conclusions and future perspectives of the study

Morphological and biochemical parameters of the blood of rabbits from the control and experimental groups before the use of biologically active additive “Huminorm plus” (first day) do not go beyond the physiological limits.

An increase of haemoglobin content (1.1 times) was recorded in the blood of rabbits of the experimental group after the use of “Huminorm plus” (50th day).

After the use of “Huminorm plus” (50th day), a higher concentration of the total protein and albumin (1.1 times), total calcium (1.2 times), urea (1.7 times), creatinine (1.3 times) was observed together with the lower concentration of inorganic phosphorus (1.2 times) and g-GT (1.8 times) in the blood serum of rabbits of the experimental group compared to those in the control group.

The content of Ca, Mn, Zn, Fe and Cu in the blood plasma of rabbits of the

5. The indicators of productivity in fattening New Zealand White rabbits, *M ± m, kg*

Group of animals	Age of animals, days					Average weight gain per day	Weight gain over the studied period (50 days)
	60	74	90	100	110		
Control, n=7	1.34 ± 0,06	1.72 ± 0,09	1.94 ± 0,11	2.15 ± 0,07	2.51 ± 0,08	0.023 ± 0.001	1.17 ± 0.04
Experimental, n=10	1.34 ± 0,06	1.82 ± 0,08	2.32 ± 0,12	2.44 ± 0,08	2.66 ± 0,08	0.026 ± 0.001	1.316 ± 0.072

experimental group has become higher (2.4, 1.5, 1.6, 1.4 and 1.6 times, respectively) as compared to those in individuals of the control group.

On the 50th day of the experiment, catalase activity in the erythrocytes of rabbits of the experimental group was 1.6 times lower than that of the control group.

The use of biologically active additive "Huminorm Plus" for rabbits in the age of 60 days over 50 days increased body weight by 12 % compared with that in the control group. The most appropriate is the use of this additive during 30 days.

It is promising to study the effect of complex biologically active additives which include glauconite, salts of humic and fulvic acids, succinic acid and organic compounds of Mn, Zn, Cu, Co and Fe used in different ways (internally and parenterally) and compare them with each other in the effectiveness of the application and impact on the body of New Zealand White rabbits.

References

- Ahmadi, M., Pet, I., Stef, L., Dumitrescu, G., Patruica, S., Nicula, M., Ciochina, L. P., Popa, M. & Dronca, D. (2019). Blood serum minerals – in vivo mineral interactions following iron overload. *Revista de Chimie*, 70(11):4073-4076. <https://doi.org/10.37358/RC.19.11.7704>
- Bogoslovskaja, O. A., Lobaeva, T. A. & Bajtukalov, T. A. (2007). *Sravnitelnoe issledovanie ranozazhivljajushchego dejstva veshchestv razlichnoj prirody* [Comparative study of the wound healing effect of substances of various nature]. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*, 6(32): 91-99. (in Russian)
- Brechka, N., Bondarenko, V., Morozenko, D., Grushanska, N., Sharandak, P., Selukova, N. & Danilchenko, S. (2019). The state of prooxidant-antioxidant balance in prostate gland of rats with cryo-trauma and its correction with drugs of natural origin. *Georgian medical news*, 296:91-95.
- Carpenter, J. W. & Marion, C. J. (2018). *Exotic Animal Formulary*. 5th edition. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Chiericato, G. M., Rizzi, C., Ravarotto, L. & Zakaria, H. (2000). Circulating levels of metabolites, enzymes and minerals of Grimaud female rabbits from weaning to 120 days of age. *World rabbits' science association*, 8(1):111-116.
- Fedak, N. M., Vovk, Y. S. & Chumachenko, S. P. (2012). *Mineralni rechovyny v godivli silskohospodarskykh tvaryn* [Minerals in the feeding of farm animals]. *Peredg-irne ta girske zemlerobstvo i tvarynnyctvo*, 54(1):128-135. (in Ukrainian)
- Fedorchenko, M. M. (2016). *Deyaki pokaznyky antyoksydantnoho zakhystu u plazmi krovi ta pechinsi kroliv* [Some indicators of antioxidant protection in rabbit blood plasma and liver]. *Naukovy visnyk LNUVMBT imeni S. Z. Gzhytskoho*, 18(1-65):147-152. (in Ukrainian)
- Fedoruk, R. S. & Lesyk, J. V. (2009). *Osoblyvosti zhyvlennia kroliv za suchasnykh metodiv vedennia krolivnyctva* [Features of feeding rabbits with modern methods of rabbit breeding]. *Biologija tvaryn*, 11(1/2):91-103. (in Ukrainian)
- Filipova, O. B., Kijko, E. I. & Maslova, N. I. (2019). *Sorbtsija metallov na glaukonite v uslovijakh zheludochno-kishechnogo trakta teljat* [Sorption of metals on glauconite in the conditions of gastrointestinal tract of calves]. *Rossijskaja selskohozjajstvennaja nauka*, 5:44-48. (in Russian), doi: 10.31857/S2500-26272019544-48.
- Hall, E. R. (1952). Investigations on the microbiology of cellulose utilization in domestic rabbits. *Journal of Microbiology*, 7(3-4):350-357. <https://doi.org/10.1099/00221287-7-3-4-350>
- Kuzmenko, O. A., Bomko, V. S., Babenko, S. P. & Gorchanok, A. V. (2019). *Vplyv zmishanoligandnoho kompleksu Kuprumu na zhyvnu masu i vytraty kormiv molodniaku kroliv za*

- vyroshhuvannya na mjaso [Impact of Cu-prum mixed ligand complex on live weight and feeding costs of rabbit young breeding feeds]. Problemy godivli tvaryn v umovakh vysokointensyvnykh tekhnologiy vyrobnytva i pererobky produkciï tvarynnytva: materialy Mizhnarodnoi naukovy-praktychnoi konferencii prysvjachenoï 80-richchiu vid dnia narodzhennia doktora s.-g. nauk, profesora Leonida Sydorovycha Djachenka 1–2 liutogo 2019 roku. BNAU, Bila Tserkva:14-16. (in Ukrainian)
- Lemesheva, M. M. & Jurchenko, V. V. (2009). Biologichna rol cynku [The biological role of Zinc]. Problemy zooinzhenerii ta veterynarnoi medycyny, 19(1):300-303. (in Ukrainian)
- Mista, D., Rzasa, A., Szmanko, T., Zawadzki, W., Styczynska, M., Pintal, A. & Kroliczewska, B. (2012). The effect of humic-fatty acid preparation on production parameters and meat quality of growing rabbits. Annals of animal science, 12(1):117-126. <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0010-x>
- Pedan, L. R. (2013). Profilaktyka vplyvu chynnykiv navkolyshniogo seredovyshcha na zdorovia za dopomogy mikroelementu Marganciu (ogliad literatury) [Preventing environmental impacts on health with the Manganese micronutrient (literature review)]. Gigijena naselenyh misc, 62:326-345. (in Ukrainian)
- Raafat, B. M., El-Barbary, A., Tousson, E. & Aziz, S. W (2011). Di-mercapto succinic acid (DMSA) and vitamin C chelating potency in lead intoxication, regarding oxidative stress and apoptotic related proteins in rabbits. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 9(2):121-131. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2011.09.004>
- Romanchuk, L. D. & Annamuhamedova, O. O. (2002). Vplyv mikroelementnykh dobavok na okremi pokaznyky fiziologichnoho statusu vidgodivel'nogo molodniaka v umovakh dovgotryvaloho radiacijnoho zabrudnennia u malykh dozakh [Influence of micronutrient additives on individual indicators of physiological status of fattening young animals under conditions of long-term radiation contamination in small doses]. Visnyk DAU Zoookologija, 2:90-94. (in Ukrainian)
- Salama, M., Morsy, W., Mohamed, R. & El-Midany, S. (2019). Effect of some feed-additives on the growth performance, physiological response and histopathological changes of rabbits subjected to ochratoxin-A feed contamination. Slovenian veterinary research, 56(22):499-508. <https://doi.org/10.26873/SVR-787-2019>
- Vorobiev, V.I. & Ulihina, L. I. (2007). Mineralnye veshchestva v zhizni krolikov [Mineral substances in the life of rabbits]. CNTJeP, Astrahan, 18. (in Russian)
- Willis, K. (2015). An investigation of the effects of fluvic and humic acids on the absorption of selected drugs, vitamins and minerals using the everted mouse gut model. Magister Scientiae in Pharmacology. Pretoria (Manuscript).
- Zadnypriany, I. V., Sataieva, T. P., Tretiakova, O. S. & Zukow, W. (2019). Miocardial interstitial matrix as novel target for succinic acid treatment strategies during experimental hypobaric hypoxia. Russian Open Medical Journal, 8(2):1-6. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2019.0201>

Корнійчук Ю. В. (2020). ПРОФІЛАКТИКА ПОРУШЕНЬ ОБМІНУ МІНЕРАЛЬНИХ РЕЧОВИН У КРОЛІВ НА ВІДГОДІВЛІ. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 11(2): 31–42, <https://doi.org/10.31548/ujvs2020.02.003>

Анотація. Основною причиною ослаблення організму кролів є дефіцит поживних (якісного протеїну) і біологічно активних речовин у раціоні. Це завдає великих економічних збитків господарствам через масові захворювання і падіж тварин, які виникають внаслідок

порушення обміну речовин, зокрема макро- і мікроелементів. Актуальним на сьогодні є пошук нетоксичних і високоефективних профілактичних препаратів комплексної дії, що позитивно впливають на метаболізм мінеральних речовин в організмі тварин.

Дослідження проводили у господарстві Київської області. Морфологічні показники крові визначали стандартними методами. Біохімічні показники крові досліджували наборами реактивів на напіваавтоматичному аналізаторі. Вміст хімічних елементів у плазмі крові досліджували методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно-зв'язаною плазмою на приладі Optima 2100 DV. У роботі викладені матеріали щодо визначення біохімічного статусу організму кролів на відгодівлі за профілактики мікроелементозів із використанням нового експериментального екологічно чистого засобу.

Досліджено вміст загального білка, альбумінів, глюкози, Кальцію загального, Фосфору неорганічного, білірубину загального, сечовини, креатиніну, ТБК-активних продуктів, Феруму, Мангану, Купруму, Цинку, Кобальту та активність АЛТ, АСТ, ЛФ, ГГТ і каталази в крові кролів, на першу та 50-у добу застосування біологічно активної добавки «Гуміном плюс». У крові кролів за застосування засобу «Гуміном плюс» на 50 добу досліду встановлено вірогідно вищий уміст гемоглобіну в 1,1 раза, загального білку і альбумінів – в 1,1 раза, Кальцію загального – в 1,2 раза, сечовини – в 1,7 раза, креатиніну – в 1,3 раза, Мангану – в 1,5 раза, Цинку – в 1,6 раза, Феруму – в 1,4 раза, Купруму – в 1,6 раза, нижчу концентрацію фосфору неорганічного в 1,2 раза та ГГТ – в 1,8 раза порівняно з відповідними показниками тварин контрольної групи. Встановлено позитивний вплив профілактичного засобу на показники гемопоєзу, метаболізм білків, мінеральних речовин і функціональний стан печінки у кролів на відгодівлі.

Розробка і застосування нетоксичних засобів для профілактики порушень обміну мінеральних речовин у кролів є перспективним напрямом досліджень.

Ключові слова: біохімічні показники, мікроелементи, ТБК-активні продукти, кров, БАД, кролі новозеландської білої породи

Подано до друку 12 травня 2020 року

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАЛЕЖНОСТІ ОРГАНОЛЕПТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ СУШЕНИХ ФРУКТІВ ВІД ПОКАЗНИКА БЕЗПЕЧНОСТІ ЗА ВМІСТОМ СІРЧИСТОГО АНГІДРИДУ

Н. І. КЛЯП, кандидат ветеринарних наук, науковий співробітник лабораторії органолептичних та фізико-хімічних досліджень науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу,
<https://orcid.org/0000-0002-2271-0682>

А. В. МАСЛЮК, начальник лабораторії органолептичних та фізико-хімічних досліджень науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу,
<https://orcid.org/0000-0002-4161-8080>

Л. Р. БІРЮЧЕНКО, провідний лікар лабораторії органолептичних та фізико-хімічних досліджень науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу,
<https://orcid.org/0000-0003-2271-3135>

О. О. КРАЧКОВСЬКА, начальник лабораторії визначення ветеринарних препаратів та забруднювачів науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу,
<https://orcid.org/0000-0002-8813-5000>

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна

О. М. ЯКУБЧАК, доктор ветеринарних наук, професорувач кафедри ветеринарно-санітарної експертизи,
<https://orcid.org/0000-0002-9390-6578>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: nzoltan@ukr.net; maslychok@ukr.net; titorluda@gmail.com; aozka@meta.ua; olga.yakubchak@gmail.com

Анотація. Проблема забезпечення населення якісними, екологічно безпечними продуктами харчування має велике медичне і соціально-економічне значення. Для стабілізації органолептичних показників якості продукту (збереження яскравості кольору, аромату і смаку, уникнення потемніння і гниття фруктів) під час сушіння їх піддають попередній обробці діоксидом сірки (сірчистий ангідрид, SO_2). В Україні SO_2 входить до списку дозволених харчових добавок і вважається безпечною для здоров'я за умови дотримання гранично допустимих норм використання. Однак, результати досліджень світових науковців свідчать про те, що вживання продуктів із вмістом сірчистого ангідриду наносить шкоду для людського здоров'я. Метою даних досліджень є встановлення залежності

органолептичних показників якості проб сушених фруктів від показника безпечності за вмістом сірчистого ангідриду та впливу витримки проб сушених абрикос у воді (8–13 °C) на вміст сірчистого ангідриду.

Дослідження проводилися на базі лабораторії органолептичних та фізико-хімічних досліджень науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ). Для контролю показників якості сушених слив, фініків та абрикос було проведено органолептичні дослідження згідно вимог ДСТУ 8471:2015. Для дослідження безпечності даних продуктів визначали загальний вміст діоксиду сірки ацидиметричним та нефелометричним методами згідно ДСТУ ISO 5522:2004.

Результати органолептичних досліджень свідчать про те, що кожна із досліджуваних проб сушених фруктів відповідала органолептичним показникам якості ДСТУ 8471:2015. Результати проведених фізико-хімічних досліджень свідчать про безпечність даних проб сушених фруктів за вмістом діоксиду сірки, так як отримані значення не перевищували гранично допустимих норм для споживання: середнє значення загального вмісту сірчистого ангідриду в пробах сушених слив – $30,8 \pm 4,8$ мг/кг, сушених фініків – $22,4 \pm 2,8$ мг/кг, сушених абрикос – $61,8 \pm 13,1$ мг/кг. Проаналізувавши результати органолептичних та фізико-хімічних досліджень, нами не встановлено прямої залежності органолептичних показників якості сушених фруктів від показника безпечності за вмістом сірчистого ангідриду.

Також проведено експериментальні дослідження, метою яких було встановити вплив витримки досліджуваних проб сушених абрикос (середнє значення загального вмісту діоксиду сірки – $61,8 \pm 13,1$ мг/кг) у воді (8–13 °C) на вміст сірчистого ангідриду. Результати визначення загального вмісту сірчистого ангідриду у досліджуваних пробах сушених абрикос вказують на вірогідне ($P < 0,01$) зниження цього показника порівняно із значеннями первинних досліджень вмісту SO_2 у даних зразках: № 1 – $11 \pm 0,2$ мг/кг, № 2 – $18 \pm 0,2$ мг/кг, № 3 – $23 \pm 0,1$ мг/кг, № 4 – $16 \pm 0,2$ мг/кг, № 5 – $5 \pm 0,1$ мг/кг (зниження на 82 %, 80,2, 71, 69,2 та 81,4 % відповідно).

Ключові слова: сушені фрукти, органолептичні дослідження, вміст сірчистого ангідриду

Актуальність

Питання забезпечення населення якісними, екологічно безпечними продуктами харчування має велике медичне і соціально-економічне значення. Фрукти – одна з невід’ємних складових раціону харчування людини, оскільки вони містять всі необхідні мінеральні речовини, вітаміни, пектин, клітковину, органічні кислоти тощо. Однак, необхідно зазначити, що фрукти – це

сезонні продукти, який через високий вміст вологи (75 – 95 %) швидко псується. У зв’язку з цим сушіння – оптимальний спосіб одержання продуктів тривалого зберігання, що мають значно вищу енергетичну і харчову цінність, ніж свіжі фрукти. Так, сухофрукти містять 62 – 72 % вуглеводів, зокрема 46 – 66 % цукрів, 1,8 – 5,2 % білків, 1,2 – 5,0 % органічних кислот, 1,5 – 4,5 % мінеральних речовин (Tarasenko et al., 2015; Lou et al., 2017).

Для стабілізації товарного вигляду, уникнення потемніння і гниття продукції, під час сушіння її піддають попередній обробці діоксидом сірки (сірчистий ангідрид SO_2). За міжнародною класифікацією харчових добавок SO_2 відносять до групи консервантів з порядковим номером E 220 (Ruiz-Capillas & Jimenez-Colmenero, 2008; Luis, 2016; Silva & Lidon, 2016). Однак результати наукових досліджень свідчать про те, що вживання продуктів з вмістом добавки E 220 наносить шкоду для людського здоров'я, оскільки призводить до руйнування вітаміну B_1 , а в чутливих людей – може викликати тяжкі алергічні реакції (Luis, 2016; Zaikov et al., 2017).

Вище зазначені літературні дані вказують на актуальність питання контролю вмісту сірчистого ангідриду в продуктах, які споживаються населенням України.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Сірки діоксид, натрію сульфід, натрію гідросульфід, натрію метабісульфід та інші консерванти широко використовуються в харчовій промисловості для поліпшення органолептичних властивостей продуктів: максимального збереження зовнішнього вигляду, яскравості кольору і аромату, уникнення потемніння, а також інгібування росту мікроорганізмів, зокрема, дріжджів, що призводить до швидкого псування продукту (Freedman, 1980; Bemrah et al., 2008; Silva & Lidon, 2016; Lou et al., 2017).

В якості харчових добавок сульфіти вперше були застосовані в 1664 році та затверджені в США ще в 1800-х роках. Впродовж тривалого часу ці хімічні речовини вважалися безпечними для здоров'я (Lester, 1995). Однак в подальшому

результати наукових досліджень довели, що сульфіти провокують виникнення алергічних реакцій, які в більшій мірі проявляються у хворих із стероїдозалежною формою бронхіальної астми (Freedman, 1980; Lester, 1995; Ruiz-Capillas & Jimenez-Colmenero, 2008; Lou et al., 2017). Реакція на SO_2 може проявлятися порушенням роботи дихальної, серцево-судинної систем, розладами шлунково-кишкового тракту чи висипаннями на шкірі. Важкі неспецифічні ознаки та симптоми трапляються рідше (Lester, 1995; Vally et al., 2009).

В Україні сірки діоксид входить до списку дозволених харчових добавок і вважається безпечним для здоров'я за дотримання максимально допустимих рівнів використання. Згідно Регламенту Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 1333/2008 від 16 грудня 2008 року вміст сірчистого ангідриду в сушених овочах і фруктах не повинен перевищувати 2000 мг/кг. Відповідно до вимог European Food Safety Authority (European Food Safety Authority, 2016) вміст сірки діоксиду у сушених абрикосах, персиках, винограді, чорносливі та інжирі не повинен перевищувати 2000 мг / кг, водночас у сушених яблуках і грушах максимально допустимий рівень 600 мг / кг.

Мета дослідження – встановити залежність органолептичних показників якості сушених слив, фініків і абрикос від показника безпечності за вмістом сірчистого ангідриду; встановити вплив витримки проб сушених абрикос у воді (8–13 °C) на вміст сірчистого ангідриду.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилися на базі лабораторії органолептичних та фізико-хімічних досліджень науково-до-

слідного хіміко-токсикологічних відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ).

Матеріалом для дослідження було відібрано по п'ять проб сушених абрикос, слив та фініків, які надходили на випробування в ДНДІЛДВСЕ. Для контролю показників якості сушених фруктів було проведено органолептичні дослідження згідно вимог ДСТУ 8471:2015 (DSTU 8471:2015, 2017). Для визначення безпечності даних проб продуктів визначали загальний вміст сірчистого ангідриду ацидиметричним та нефелометричним методами згідно ДСТУ ISO 5522:2004 (DSTU ISO 5522:2004, 2005).

Результати дослідження та їх обговорення

Результати органолептичних досліджень свідчать про те, що кожна із досліджуваних проб сушених фруктів відповідала органолептичним показникам якості ДСТУ 8471:2015. Слід зауважити, що органолептичні показники всіх досліджуваних проб сушених слив, як і показники всіх проб сушених фініків, не відрізнялися між собою (табл. 1).

Проби сушених абрикос дещо відрізнялися за окремими органолептичними показниками (табл. 2).

Слід зазначити, що результати органолептичного дослідження всіх проб сушених слив, фініків та абрикос проби № 2 і 4 вказують на відмінний стан показників якості (яскравий насичений колір, поверхня блискуча, консистенція м'ясиста), що могло бути досягнуто підвищеним вмістом у даних продуктах консерванту SO_2 . Однак результати проведених хімічних досліджень свідчать про безпечність даних проб сушених фруктів, так як загальний вміст сірки діоксиду не перевищував гранично допустимого рівня для споживання (табл. 3).

Проаналізувавши результати органолептичних та фізико-хімічних досліджень, нами не встановлено прямої залежності органолептичних показників якості сушених фруктів від умісту в них сірчистого ангідриду. Так, органолептичні показники всіх досліджуваних проб сушених слив, фініків і абрикос відповідали критеріям якості згідно з вимогами національного стандарту ДСТУ 8471:2015. Особливу увагу привертала яскравий насичений колір, блиск та м'ясистість усіх проб сушених слив, фініків, а також абрикос проби № 2 і 4.

1. Характеристика показників органолептичного дослідження проб сушених слив і фініків

Вид сушених фруктів	Назва показника		
	Зовнішній вигляд і форма	Колір	Смак та запах
Сушені сливи	Цілі плоди з видаленою кісточкою, половинки плодів правильної овальної форми, одного виду, з непошкодженою шкірочкою	Однорідний, яскравий, відповідний до помологічного сорту	Властиві фруктам цього виду. Без стороннього смаку та запаху
Сушені фініки	Цілі плоди з кісточкою, одного виду, з непошкодженою шкірочкою	Однорідний, відповідний до помологічного сорту	Властиві фруктам цього виду. Без стороннього смаку та запаху

2. Характеристика показників органолептичних досліджень проб сушених абрикос

Номер проби	Назва показника		
	Зовнішній вигляд і форма	Колір	Смак та запах
1	Цілі приплюснуті плоди з видаленою кісточкою, одного виду, з непошкодженою шкірочкою	Темно-помаранчевий, однотонний, без плям і потемнінь	Властиві фруктам цього виду. Без стороннього смаку та запаху
2	Цілі приплюснуті плоди з видаленою кісточкою, одного виду, з непошкодженою шкірочкою	Світло-помаранчевий, яскравий, однотонний, без плям і потемнінь	Властиві фруктам цього виду. Без стороннього смаку та запаху
3	Цілі приплюснуті плоди з видаленою кісточкою, одного виду, з непошкодженою шкірочкою	Темно-помаранчевий, однотонний, без плям і потемнінь	Властиві фруктам цього виду. Без стороннього смаку та запаху
4	Цілі приплюснуті плоди з видаленою кісточкою, одного виду, з непошкодженою шкірочкою	Світло-помаранчевий, яскравий колір, однотонний, без плям і потемнінь	Властиві фруктам цього виду. Без стороннього смаку та запаху
5	Цілі приплюснуті плоди з видаленою кісточкою, одного виду, з непошкодженою шкірочкою	Темно-помаранчевий, однотонний, без плям і потемнінь	Властиві фруктам цього виду. Без стороннього смаку та запаху

3. Загальний вміст сірчистого ангідриду в досліджуваних пробах сушених фруктів, мг / кг ($n = 5, M \pm m$)

Номер проби	Вид сушених фруктів		
	Сливи	Фініки	Абрикоси
1	36,0 ± 0,3	26,0 ± 0,1	61,0 ± 0,1
2	41,0 ± 0,1	19,0 ± 0,2	91,0 ± 0,3
3	24,0 ± 0,3	28,0 ± 0,2	78,0 ± 0,2
4	32,0 ± 0,1	16,0 ± 0,2	52,0 ± 0,2
5	21,0 ± 0,1	23,0 ± 0,1	27,0 ± 0,1
Середнє значення	30,8 ± 4,8	22,4 ± 2,8	61,8 ± 13,1

У цих досліджуваних пробах не було виявлено сушених плодів із плямами і потемніннями. Такі ознаки свідчили про можливе перевищення вмісту консерванту в даних сухофруктах. Однак середнє значення вмісту SO_2 у пробах сушених слив становило $30,8 \pm 4,8$ мг/кг, а у пробах фініків – $22,4 \pm 2,8$ мг/кг (за максимально допустимого рівня 2000 мг/кг).

Відмінній оцінці за органолептичними показниками якості суше-

них абрикос відповідали проби № 2 і 4, однак найвищий рівень сірчистого ангідриду було встановлено у пробах № 2, 3 і 1 – $91,0 \pm 0,3$, $78,0 \pm 0,2$ і $61,0 \pm 0,1$ мг/кг, відповідно. Можливо, висока оцінка органолептичних показників якості сушених абрикос проб № 2 і 4, зокрема, світло-помаранчевий яскравий колір та відсутність плям і потемнінь, свідчить про свіжість даних продуктів. Адже згідно літературних даних (Bemrah et al., 2008; Ruiz-Capillas

& Jimenez-Colmenero, 2008; Ozturk et al., 2011; Shoaee et al., 2019) показник вмісту у сухофруктах сірчистого ангідриду залежить від багатьох факторів: концентрації у сушених фруктах SO_2 після їх обробки, способу сушіння плодів, терміну і умов зберігання оброблених сухофруктів, а також методу визначення вмісту сірчистого ангідриду.

Загалом середнє значення вмісту SO_2 у досліджуваних пробах сушених абрикос було значно нижчим (61,8 мг/кг) порівняно з результатами досліджень Shoaee, Khorshidi & Heshmati проведених в Ірані, в яких цей показник становив 1204,0 мг/кг (Shoaee et al., 2019). Контроль показника безпечності сушених фруктів за вмістом сірчистого ангідриду здійснюється в багатьох країнах світу (табл. 4).

Більшість харчових добавок не мають, як правило, харчового призначення і є біологічно інертними для організму. Проте результати науковців Lillian Chen, Brian De Borja та Jeffrey Rohrer свідчать, що будь-яка хімічна сполука або речовина в певних умовах може бути токсичною (Chen et al., 2016). Зокрема, є дані, що реакція на сульфіти (сірки діоксид, натрію сульфід, натрію гідросульфід, натрію метабісульфіт, калію метабісульфіт) частіше (в 5 – 13 % випадків) проявляється у хворих із стероїдозалежною формою бронхіальної астми, а також у тих осіб, які стражда-

ють на непереносимість нестероїдних протизапальних засобів і atopічний дерматит. Описані поодинокі випадки розвитку анафілактичних реакцій на сульфіти, а також шкірні (кропив'янка, набряк Квінке, контактний дерматит) і респіраторні (бронхоспазм, професійна бронхіальна астма, набряк гортані) прояви алергічних реакцій (Lester et al., 1995; Vally et al., 2009; Chen et al., 2016; Zaikov et al., 2017).

Як відомо, крім сушених фруктів, сульфіти містяться у вині, пиві, сидрі, свіжих фруктах та овочах, горіхах, м'ясних продуктах, кондитерських виробках, фруктових та овочевих соках, соусах (Ruiz-Capillas & Jimenez-Colmenero, 2008; Altunay & Gürkan, 2016). З урахуванням результатів наших досліджень та попередньо зазначеними даними науковців, можна допустити, що людина, яка споживає сухофрукти, навіть з допустимим вмістом сірки діоксиду, може завдавати шкоди власному здоров'ю. У зв'язку з цим, наступним етапом наших досліджень було експериментально визначити спосіб зниження вмісту сірчистого ангідриду в сушених фруктах для досягнення максимальної безпечності даних продуктів.

Mischek & Krapfenbauer-Cermak стверджують, що сірки діоксид – легка речовина, а тому вміст SO_2 у сухофруктах може залежати від терміну

4. Середні значення вмісту сірчистого ангідриду в сушених фруктах згідно результатів досліджень науковців різних країн світу

Країна	Середнє значення, мг/кг	Рік проведення досліджень	Посилання
Іран	700,63	2019	Shoaee et al., 2019
Австралія	339,5	2012	Mischek & Krapfenbauer-Cermak, 2012
Бельгія	179,0	2010	Vandevijvere et al., 2010
Франція	1005,9	2008	Bemrah et al., 2008
Корея	1070,0	2007	Suh et al., 2007

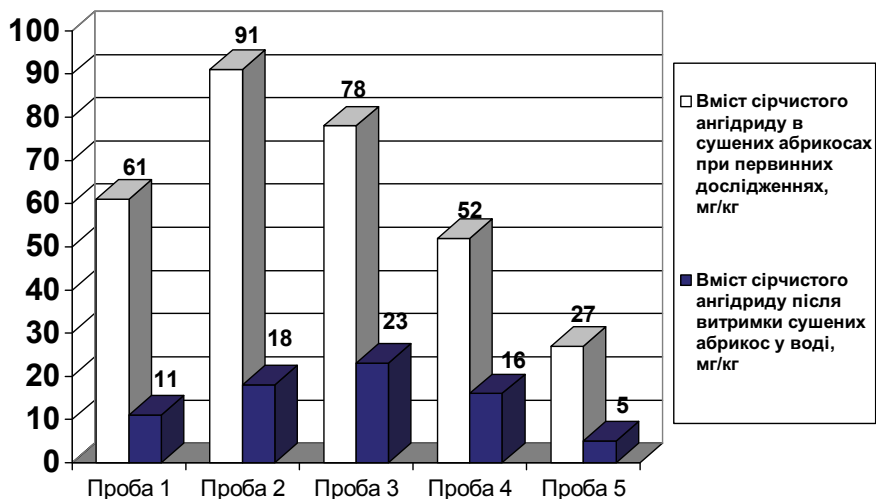


Рис. 1. Динаміка зміни загального вмісту сірчистого ангідриду в сушених абрикосах внаслідок витримування досліджуваних проб у воді, мг / кг

і умов зберігання оброблених продуктів (Mischek & Krapfenbauer-Cermak, 2012). Ozturk, Konak, Ozturk et al., встановили зниження вмісту сірчистого ангідриду в сушених абрикосах з 1586 мг/кг (на початку досліду) до 1091 мг/кг після 12 місяців зберігання досліджуваних зразків сухофруктів за температури повітря 4 – 13 °С. Під час проведення експериментальних досліджень науковці виявили зміни органолептичних показників якості сушених плодів залежно від зниження вмісту сірчистого ангідриду: впродовж року досліджень колір сушених абрикос ставав більш тьмяним і темним, а консистенція – менш м'якшою і щільною (Ozturk et al., 2011).

Крім того, сірки діоксид здатний до розчинності у воді низьких температур (розчинність у воді: 22,97 г/100 мл за 0 °С; 11,58 г/100 мл за 20 °С та 9,4 г/100 мл за 25 °С) (European Food Safety Authority, 2016; Luis, 2016; Lydyn et al., 2000). Вище зазначені дані вказують на можливість зниження вмісту сірки діоксиду в сушених фруктах після

витримки їх впродовж певного часу у воді. З метою проведення експериментальних досліджень, проби сушених абрикос № 1–5 (оскільки саме в цьому виді сушених фруктів нами було визначено найвищий вміст сірчистого ангідриду) впродовж 1 години витримували у воді 8–13 °С, при цьому 4 рази промивали досліджуваний матеріал і змінювали воду.

Результати визначення загального вмісту сірчистого ангідриду у досліджуваних пробах сушених абрикос вказують на вірогідне ($P < 0,01$) зниження цього показника порівняно із значеннями первинних досліджень вмісту SO_2 у даних пробах: № 1 – $11 \pm 0,2$ мг/кг, № 2 – $18 \pm 0,2$ мг/кг, № 3 – $23 \pm 0,1$ мг/кг, № 4 – $16 \pm 0,2$ мг/кг, № 5 – $5 \pm 0,1$ мг/кг (рис. 1).

Отримані результати експериментальних досліджень свідчать про те, що витримування сушених абрикос у воді 8 – 13 °С впродовж однієї години призводить до зниження вмісту сірки діоксиду в пробах № 1 – 5 на 82 %, 80,2, 71, 69,2 та 81,4 %, відповідно.

Висновки і перспективи

Результати органолептичних досліджень усіх проб сушених слив, фініків та абрикос проб № 2 і 4 вказують на відмінний стан показників якості (яскравий насичений колір, поверхня блискуча, консистенція м'ясиста). Інші проби досліджених сушених фруктів також за органолептичними показниками відповідали вимогам чинних національних стандартів.

Хімічні дослідження сушених фруктів свідчать про їх безпечність, оскільки загальний вміст сірки діоксиду не перевищував максимально допустимого рівня для споживання.

За результатами проведених нами органолептичних та хімічних досліджень не виявлено прямої залежності органолептичних показників якості сушених фруктів від вмісту в них сірчистого ангідриду.

Витримування сушених абрикос у воді за температури 8–13 °С впродовж однієї години призводить до зниження вмісту сірки діоксиду в пробах № 1–5 на 82 %, 80,2, 71, 69,2 та 81,4 %, відповідно.

Майбутні дослідження будуть спрямовані на вивчення залежності вмісту сірки діоксиду в сухофруктах, залежно від терміну і умов зберігання даних продуктів.

References

- Bemrah, N., Leblanc, J. C. & Volatier, J. L. (2008). Assessment of dietary exposure in the French population to 13 selected food colors, preservatives, antioxidants, stabilizers, emulsifiers and sweeteners. *Food Additives and Contaminants: Part B*. 1: 2 – 14. doi: 10.1080/19393210802236943.
- Chen, L., Borba, B. & Rohrer, J. (2016). Determination of total and free sulfite in foods and beverages. *Thermo fisher scientific*, 54: 1 – 8.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2016). Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS). Scientific opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227), and potassium bisulfite (E 228) as food additives. *EFSA Journal*. 14: 4438. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4438.
- Freedman, B. J. (1980). Sulphur dioxide in foods and beverages: its use as a preservative and its effect on asthma. *Br. J. Dis. Chest.*, 74(2):128–134. doi:10.1016/0007-0971(80)90023-6.
- Frukty kistochkovi susheni. Tekhnichni umovy [Dried stone fruits. Specification]. (2017). DSTU 8471:2015 from 2017. Kyiv. (in Ukrainian)
- Frukty, ovochi ta produkty pereroblennia. Vyznachannia zahalnoho vmistu sirchystoho anhidrydu. [Fruits vegetables and derived products. Determination of total sulphur dioxide content]. (2005). DSTU ISO 5522:2004 from 2005. Kyiv. (in Ukrainian)
- Lester, M. R. (1995). Sulfite sensitivity: significance in human health. *J. Am. Coll. Nutr.*, 14(3): 229 – 232. doi:10.1080/07315724.1995.10718500.
- Lou, T., Huang, W., Wu, X., Wang, M., Zhou, L., Lu, B., Zheng, L. & Hu, Y. (2017). Monitoring, exposure and risk assessment of sulfur dioxide residues in fresh or dried fruits and vegetables in China. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 34: 918 – 927. doi: 10.1080/19440049.2017.1313458.
- Luis, F. (2016). Guido Sulfites in beer: reviewing regulation, analysis and role. *Scientia Agricola*, 73 (2): 189 – 197. doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0290.
- Lydyn, R. A., Molochko, V. A. & Andreeva, L. L. (2000). Khymycheskye svoistva neorhanycheskykh veshchestv [Chemical properties of inorganic substances]. Moskva.: Khimiia, 455. (in Russian)

- Mischek, D. & Krapfenbauer-Cermak, C. (2012). Exposure assessment of food preservatives (sulphites, benzoic and sorbic acid) in Austria. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 29: 371 – 382. doi: 10.1080/19440049.2011.643415.
- Ozturk, K., Konak, R., Ozturk, B., Atay, S., Celik, B., Yanar, M., Demirtas, M. N. & Ercisli, S. (2011). Effects of sulphurization duration of doses and cold storage on SO₂ content of dried apricot fruits of cv. 'Hacihaliloglu'. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39: 237 – 241. doi: 10.15835/nbha3926235.
- Ruiz-Capillas, C. & Jimenez-Colmenero, F. (2008). Review Determination of preservatives in meat products by flow injection analysis (FIA). *Food Additives and Contaminants*, 25(10): 1167 – 1178. doi:10.1080/02652030802036214.
- Shoaei, F., Khorshidi, M. & Heshmati, A. (2019). The Risk Assessment of Sulphite Intake through Dried Fruit Consumption in Hamadan, Iran. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. 6: 121 – 127. doi: 10.18502/jfqhc.6.3.1386.
- Silva, M. M., Lidon & F. (2016). Food preservatives-An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 28: 366 – 373. doi: 10.9755/ejfa.2016-04-351.
- Suh, H. J., Cho, Y. H., Chung, M. S. & Kim, B. H. (2007). Preliminary data on sulphite intake from the Korean diet. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20: 212 – 219. doi: 10.1016/j.jfca. 2006.04.012.
- Tarasenko, T. A., Yevlash, V. V. & Niemirich, O. V. (2015). Teoretychne doslidzhennia sposobiv sushinnia ovochiv ta fruktiv [Theoretical study of methods of drying vegetables and fruits]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT im. S.Z. Hzhyskoho. – Scientific Bulletin of LNUVMBT them. S. Gzitsky*, 4(64): 148 – 158. (in Ukrainian)
- Vally, H., Misso, N. L. A. & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*. 39: 1643 – 1651. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x.
- Vandevijvere, S., Temme, E., Andjelkovic, M., De Wil M., Vinkx, C., Goeyens, L. & Van Locho, J. (2010). Estimate of intake of sulfites in the Belgian adult population. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 27: 1072 – 1083. doi: 10.1080/ 19440041003754506.
- Zaikov, S. V., Varytska, H. O. & Kyrylenko, T. V. (2017). Alerhiia na alkoholni napoi: klinika, diahnozyka, likuvannia [Allergy to alcoholic beverages: clinic, diagnosis, treatment]. *Zdorovia Ukrainy. Health of Ukraine*, 4: 2 – 4. (in Ukrainian)

Klyap N.I., Maslyuk A.V., Biryuchenko L.R., Krachkovska O.O., Yakubchak O.M. (2020). RESEARCH OF THE DEPENDENCE OF ORGANOLEPTIC QUALITY INDICATORS OF DRIED FRUITS ON THE SAFETY INDICATOR OF SULFUR DIOXIDE CONTENT. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 11(2): 43–52, <https://doi.org/10.31548/ujvs2020.02.004>.

Abstract. The problem of providing the population with quality, environmentally friendly food is of great medical and socio-economic importance. To stabilize the organoleptic characteristics of the product quality: preserving the brightness of color, aroma and taste, avoiding darkening and rotting of the fruit, during drying, they are pre-treated with sulfur dioxide (SO₂). In Ukraine, SO₂ is included in the list of permitted dietary supplements and is considered to be safe for health, while adhering to maximum permissible standards of use. However, the results of research by world scientists indicate that the consumption of products containing sulfur dioxide is harmful to human health.

The purpose of these studies is to determine the dependence of organoleptic quality indicators of dried fruit samples on the safety index of sulfur dioxide content; to determine the effect of exposure of dried apricot samples in water (8–13 °C) on the content of sulfur dioxide.

The studies were conducted on the basis of the laboratory of organoleptic and physicochemical studies of the chemical and toxicological research department of the State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise (DNILDVSE). To control the quality of dried plums, dates and apricots, organoleptic studies were performed according to the requirements of DSTU 8471: 2015. To study the safety of these products, the total sulfur dioxide content was determined by acidimetric and nephelometric methods according to DSTU ISO 5522: 2004.

The results of organoleptic studies indicate that each of the dried fruit samples tested met the organoleptic quality standards of DSTU 8471: 2015. The results of the physical and chemical studies indicate the safety of the data of the samples of dried fruits by the content of sulfur dioxide, as the obtained values did not exceed the maximum permissible norms for consumption: the average value of the total content of sulfur dioxide in the samples of dried plums – 30.8 ± 4.8 mg/kg, dried dates – 22.4 ± 2.8 mg/kg, dried apricots – 61.8 ± 13.1 mg/kg. Analyzing the results of organoleptic and physicochemical studies, we have not established a direct dependence of organoleptic quality indicators of dried fruits on the safety index of sulfur dioxide content.

Experimental studies were also conducted to determine the effect of the exposure of the dried apricot samples (average total sulfur dioxide content – 61.8 ± 13.1 mg/kg) in water (8–13 °C) on the sulfur dioxide content. The results of determining the total content of sulfur dioxide in the tested samples of dried apricots indicate a significant ($P < 0.01$) decrease in this indicator compared with the values of primary studies of SO_2 content in these samples: No. 1 – 11 ± 0.2 mg/kg, No. 2 – 18 ± 0.2 mg/kg, No. 3 – 23 ± 0.1 mg/kg, No. 4 – 16 ± 0.2 mg/kg, No. 5 – 5 ± 0.1 mg/kg (decrease by 82 %, 80, 2, 71, 69.2 and 81.4 % respectively).

Keywords: dried fruits, organoleptic studies, sulfur dioxide content

Подано до друку 26 березня 2020 року

SELECTED QUALITY INDICATORS OF SUNFLOWER SEED AND OIL SOLD IN UKRAINE

V. O. USHKALOV, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director,
<http://orcid.org/0000-0001-5694-632X>

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products

O. M. YAKUBCHAK, Doctor of Veterinary Sciences, Professor Department of
veterinary hygiene named after A. K. Skorokhodko,
<https://orcid.org/0000-0002-9390-6578>

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

T. V. TARAN, PhD, associated professor, Department of veterinary hygiene
named after A. K. Skorokhodko,
<https://orcid.org/0000-0002-9370-8539>

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

S. V. MIDYK, PhD, Head of the Spectral Research Sector,
<http://orcid.org/0000-0002-2682-2884>

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products

N.YA. DUDCHENKO, Head of the Research Department for Monitoring the
Product Quality of Agroindustrial Complex,
<http://orcid.org/0000-0002-8283-5305>

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products

E-mail: ushkalov63@gmail.com; olga.yakubchak@gmail.com; ttaran@ukr.net; svit.mid@gmail.com

Abstract. Due to the growing need for healthy food, the demand for high-oleic sunflower oil is increasing every year, both in the world and in Ukraine. Oil has valuable properties for both manufacturers and consumers. Therefore, setting standards for the fatty acid composition of sunflower seeds and sunflower oil is quite relevant and important. The purpose of this work is to carry out a comparative analysis of the Ukrainian and the international regulations on the content of fatty acids in sunflower oil; to study the sunflower oil and sunflower seeds available on the Ukrainian market by separate quality indicators and to determine the proportion of high-oleic oil.

The article provides a comparative analysis of national and international regulations. The current DSTU 4492: 2017 does not have a distribution of sunflower oil according to the oleic acid content. This acid is normalized in the range of 14.0–39.4 %, which corresponds to ordinary oil. According to international requirements, sunflower oil is divided into ordinary, with an average content of oleic acid and high-oleic acid, and some more fatty acids regulated. We used gas chromatography to determine the fatty acid composition of sunflower seeds and sunflower oil samples received for research at ULQSAP during 2017–2019. It was found that the market of Ukraine had a significant

share of high-oleic oil, particularly in 2019 (57.14 %), compared to 2018 (18.8 %) and 2017 (40 %). This confirms the worldwide trend of growing varieties of high oleic acid sunflower breeds in Ukraine.

A comparative analysis of sunflower seeds by mass fraction of oil for 2017-2019 was carried out. We established that by mass fraction of oil, sunflower seeds used for the production of sunflower oil in Ukraine mainly belong to the second class.

Keywords: *fatty acids, high-oleic oil, sunflower seeds, oleic acid, the mass fraction of oil*

Introduction

The composition of sunflower oil is quite variable and depends on the type of sunflower and its place of cultivation, the method of obtaining the product and methods of its purification. The following vitamins are present in the crude oil: A, D, E, group B (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆). It is known that systematic use of oil improves the cardiovascular system (lowers cholesterol, strengthens the vascular walls, protects against atherosclerosis, severe pathologies of blood vessels and heart); oil has a positive effect on brain function (improvement of cognitive function), endocrine and urinary system; it promotes the normalization of the gastrointestinal tract function; it prevents premature aging (due to its high tocopherol content, which is three times higher than in olive oil). Sunflower oil contains a significant amount of lipids (that are not synthesized in the body and need to be obtained from food), phytosterols, vitamins. In addition, it contains linoleic, oleic, palmitic, stearic, linolenic and arachidonic fatty acids, which take part in the nervous system operation, namely in the creation of nerve tissues membranes and cell membranes.

However, the results of studies on the benefits and harms of human polyunsaturated fatty acids are controversial. In particular, the differences concern the allowable levels of ω -3, ω -6, ω -9 in the diet.

There is some evidence of the preventive effect of these acids on cardiovascular disease (Ushkalov et al., 2017; Uriho et al., 2019). At the same time, it is suggested that large amounts of ω -3 can cause prostate cancer (Sanders et al., 2014), and ω -6 increases the ratio of collagen I/III in the myocardium, which leads to stagnation in the heart and disrupts transmitral blood flow (Beam et al., 2015).

Discussions also address the issue of heat resistance of different types of edible oils. Studies on their compatibility and the possibility of combined use are being conducted. Thus, the combination of sunflower and sesame oil provides sufficient heat resistance and makes the industrial use of oils safe (Grosh et al., 2019). A mixture of rapeseed, corn, olive, peanut and high-oleic sunflower oils can prevent and control cardiovascular disease (Uriho et al., 2019).

Oleic acid ω -9 is a monounsaturated fatty acid substantially contained in olive oil. It is oleic acid that is a part of lipids – important components of cell membranes that ensure the normal course of many vital processes in the body. In the absence of oleic acid in the body, it is replaced by other fatty acids that results in dramatic change of cell membranes permeability, which in turn leads to metabolic disorders. In part, ω -9 is produced by the body itself, but a significant proportion comes from ω -9 containing products (Euralis, 2020).

Due to the growing popularity of healthy foods, the demand for high-oleic sunflower oil is increasing every year – both in Ukraine and in the world. Now the demand is being formed mainly by EU countries and is expected to increase in the nearest future due to the introduction of mandatory labeling of products with specification of oil source (Euralis, 2020). Due to the fact that the share of high-oleic sunflower is increasing every year – both in Ukraine and worldwide – the issue of establishing standards for fatty acid composition becomes quite relevant and important.

Analysis of recent researches and publications

The volume of sunflower seeds production in Ukraine is 13.3 million tons, which is about 32 % of the world volume. The production of sunflower oil is over 4.66 million tons. This is the market with prevailing export operations. The level of domestic consumption is only 450–500 million tonnes (Landlord, 2020), though some upward trend has been observed recently. Currently, there are hybrid sunflower seeds with high oleic fat content in the Ukrainian market: ES Schedule SL (89 %), ES Romantic (86 %), ES Aromatic SU (89 %). According to the 2018 data, ES seeds Schedule SL with recommended areas of forest steppe and northern steppe are grown in seven regions of Ukraine. ES Romantic seeds are recommended for steppe, forest-steppe and woodland areas in fifteen regions of Ukraine. ES Aromatic SU is cultivated in steppe, forest-steppe and woodland areas in sixteen regions of Ukraine (2018) (Euralis, 2020).

Sunflower is considered high oleic if the content of monounsaturated oleic fatty acid (Omega 9) in the oil obtained from it is more than 82 % and if

the content of polyunsaturated linoleic fatty acid (Omega 6) is low. This type of sunflower was derived by breeding methods and the genetic potential of its oleic acid content is up to 95 %, which is the highest rate among all oil crops. High-oleic sunflower oil has the highest content of natural antioxidant – vitamin E – 45 mg/100 g, which reduces the risk of cardiovascular system diseases (the main cause of premature human death nowadays), prevents the emergence of tumors and strengthens human immunity (Syngenta, 2020; Landl, 2020; Ukroliya, 2020).

Processing of traditional sunflower oil (high in linoleic fatty acid) for the production of margarine and during frying results in formation of active trans-isomers. These substances raise the blood cholesterol level, cause cardiovascular and tumor diseases («harmful» cholesterol). Trans fats raise low-density lipoprotein («bad cholesterol» or LDL-C) levels and lower high-density lipoprotein (HDL-C) levels, and thus double the risk of cardiovascular disease. During the heat treatment and hydrolysis of oils with high oleic acid content, carcinogens and cholesterol reducing cis-isomers are formed. Therefore, for more than 10 years high-oleic sunflower oil has been widely used in healthy foods production. This oil has a long cycle of use during frying at high temperatures (24-hours) and contains not more than 10 % of saturated fats. The shelf life of high-oleic oil and its derivatives (margarine) is four times longer than the shelf life of traditional oil (Manzo et al., 2019; Syngenta, 2020; Ukroliya, 2020).

Requirements for the quality of oils, and for sunflower oil in particular are presented in DSTU 4492: 2017 Sunflower oil. Specifications; GOST 30418-96

Vegetable oils. Method of determination of fatty acid composition (Vegetable oils. Methods of determination of fatty acid composition); Codex Stan 210–1999 Codex standard for named vegetable oils.

The purpose of this work was to carry out a comparative analysis of international regulations and regulations of Ukraine on the content of fatty acids in sunflower oil; to study the sunflower oil and sunflower seeds available on the Ukrainian market according to separate quality indicators and to determine the proportion of high-oleic oil.

Materials and methods of research

The research was conducted in 2017–2019 at the Ukrainian Laboratory for Quality and Safety of Products of AIC NULES of Ukraine in the context of the scientific theme: “Monitoring of quality of bioresources and production of agro-industrial complex for ensuring food and environmental safety of Ukraine”. The research material was sunflower seeds and sunflower oil from various manufacturers. Oil sampling was performed in accordance with DSTU 4349: 2004 Oils. Methods of sampling (ISO 5555: 1991, NEQ), sampling of seeds – in accordance with DSTU 4601: 2001 Oilseeds. Sampling methods.

To determine the fatty acid composition of the oil according to GOST 30418-96, the samples were thoroughly mixed. 3–5 drops of oil were taken and dissolved in 1.9 cm³ of hexane. 0.1 cm³ sodium methylate solution in methanol (2 mol/dm³) was added to the resulting solution and stirred thoroughly for 2 min. After settling (5 min), the sample was filtered through a paper filter (blue ribbon), leaving a precipitate at the bottom of the tube (GOST, 1998).

Fatty acid methyl esters (FAs) were analyzed on a Trace GC Ultra (USA) gas chromatograph with a flame ionization detector. Chromatographic conditions: column temperature 140–240 °C, detector temperature – 260 °C. The sample was introduced into the chromatograph with a 1 µl TriPlus autosampler. Duration of analysis – 65 min.

The identification of fatty acids was performed using a standard Supelco 37 Component FAME Mix sample containing 37 fatty acids. Quantitative assessment of the spectrum of fatty acids was carried out by the method of internal normalization, the content was determined in percentage. All samples were examined in 2 parallels.

Mass fraction of oil was determined according to DSTU 7577:2014. The method involves complete extraction of free lipids from the crushed seeds with solvents on a Soxhlet apparatus. The determination of the oil content was carried out on an extraction apparatus for the quantitative separation of substances from mixtures using organic solvents Solvent Extractor SER 148 (DSTU, 2014).

To calculate the oil content of the dry substance, the moisture was determined parallelly in accordance with DSTU4811:2007. The studies were performed in 2 parallels.

Statistical processing of experimental data was carried out by conventional methods of variational statistics. Statistical significance of difference in indicators was evaluated by the Student's t-criteria.

Results of the research and their discussion

According to DSTU 4492: 2017 Sunflower oil. Specifications (Appendix E) for sunflower oil present stan-

dards for 11 fatty acids. Moreover, there is no division into groups, depending on the amount of oleic acid. In this document, the requirements are presented in numerical terms and are consistent with the Codex Alimentarius requirements for 10 oleic acids of conventional oil. However, in contrast to the Code, margaric, heptadecenic, erucic, docosadienic and lignoceric acids are not standardized by the national standard. Also, the digital values are different from those presented in GOST 30623-98 for six fatty acids (Table 1). According to this regulation, only 20 fatty acids are isolated in vegetable oils. Different amounts of these fatty acids are normalized for different oils. Sunflower oil is divided into two groups according to its fat content: high oleic oil and regular. 7 fatty

acids are normalized in high-oleic oil, 13 – in normal oil.

In contrast to this, the Codex Stan 210–1999 divides sunflower seed oil into three groups, depending on the oleic acid content: high (75.0–90.7 %), medium (43–71.8 %) and low (14.0–39.4 %). This document provides standardization of 15 fatty acids for low oleic acid sunflower oil, 14 for medium oleic fatty acid sunflower oil and 15 for high oleic sunflower oil (Table 1).

In all three regulatory documents 11 fatty acids are normalized regardless the division into groups of: myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, α -linolenic, arachic, gondoic, begenic, lignoceric. As for oils with a high content of oleic fatty acids, the Codex Alimentarius normalized myris-

1. Requirements for the fatty acid composition of sunflower oil in accordance with applicable regulatory documents

The name and code of the fatty acid	DSTU 4492: 20 17	GOST 30623-98		CODEX FLAT 210-1999		
	sunflower oil	sunflower oil	high-oleic sunflower oil	sunflower-seed oil	high oleic acid	mid-oleic acid
Myristic C14:0	to 0.2	to 0.2	no norms	to 0.2	to 0.1	to 1.0
Palmitic C16:0	5.0 – 7.6	5.6 – 7.6	4.2 – 4.6	5.0 – 7.6	2.6 – 5.0	4.0 – 5.5
Palmitoleic C16:1	to 0.3	to 0.3	no norms	to 0.3	to 0.1	to 0.05
Margarine C17:0	no norms	no norms	no norms	to 0.2	to 0.1	to 0.05
Heptadecene C17:1	no norms	no norms	not norms	to 0.1	to 0.1	to 0.06
Stearic C18:0	2.7 – 6.5	2.7 – 6.5	4.1 – 4.8	2.7 – 6.5	2.9 – 6.2	2.1 – 5.0
Oleic C18:1 ω 9	14.0 – 39.4	14.0 – 39.4	61.0 – 69.8	14.0 – 39.4	75 – 90.7	43.1 – 71.8
Linoleic C18:2 ω 6	48.3 – 74.0	18.3 – 74.0	21.9 – 28.4	48.3 – 74.0	2.1 – 17	18.7 – 45.3
α -linolenic C18:3 ω 3	to 0.3	to 0.2	no norms	to 0.3	to 0.3	up to 0.5
Arachic C20:0	0.1 – 0.5	0.2 – 0.4	to 0.7	0.1 – 0.5	0.2 – 0.5	0.2 – 0.4
Gondoic C20:1 ω 9	to 0.3	to 0.2	up to 0.5	to 0.3	0.1 – 0.5	0.2 – 0.3
Begenic C22:0	0.3 – 1.5	0.5 – 1.3	0.7 – 1.2	0.3 – 1.5	0.5 – 1.6	0.6 – 1.1
Erucic C22:1	no norms	to 0.2	not about rm.	to 0.3	to 0.3	no norms
Docosadiene C22:2	no norms	to 0.3	no norms	to 0.3	not norms	to 0.09
Lignocerin C24:0	up to 0.5	0.2 – 0.3	no norms	up to 0.5	not norms	0.3 – 0.4

Note: data are presented as mass fraction of fatty acid in % of total fatty acids.

tic, palmitoleic, margaric, heptadecenic, α -linolenic, erucic fatty acids, while in GOST they are not normalized. The numerical values also differ from those given in GOST for almost all fatty acids except gondoic acid.

Thus, all described normative documents differ both in quantitative and qualitative standards.

We also analyzed the data on the fatty acid composition of sunflower oil samples received for research at the UL-QSAP during 2017–2019. By high-sen-

sitivity gas chromatography, 13 fatty acids were identified and quantified in sunflower oil: myristic (C14: 0), palmitic (C16: 0), palmitoleic (C16: 1), stearic (C18: 0), oleic (C18: 1), linoleic (C18: 2), arachin (C20: 0), α -linolenic (C18: 3 ω 3), gondoin (C20: 1 ω 9), begenic (C22: 0), erucic (C22: 1), docosadiene (C22: 2), lignocerin (C24: 0) (Table 2).

In the current DSTU 4492: 2017 no distribution of sunflower oil by oleic acid content is presented: this acid is normalized in the range of 14.0–39.4 %,

2. Results of studies of the fatty acid composition of sunflower oil (2017–2019), $M \pm m$

The name and code of the fatty acid	Sunflower oil, 2017		Sunflower oil, 2018		Sunflower oil, 2019	
	sunflower-seed oil n = 6	high oleic acid n = 4	sunflower-seed oil n = 18	high oleic acid n = 4	sunflower-seed oil n = 15	high oleic acid n = 20
Myristic C14:0	0.070 $\pm$ 0.002	0.080 $\pm$ 0.012	0.0600 $\pm$ 0.0016	0.0400 $\pm$ 0.0014	0.080 $\pm$ 0.002	0.130 $\pm$ 0.004
Palmitic C16:0	6.94 $\pm$ 0.42	2.80 $\pm$ 0.31	5.55 $\pm$ 0.72	4.42 $\pm$ 0.99	6.58 $\pm$ 0.62	4.330 $\pm$ 0.023
Palmitoleic C16:1	0.120 $\pm$ 0.051	0.090 $\pm$ 0.005	0.0800 $\pm$ 0.0021	0.070 $\pm$ 0.002	0.100 $\pm$ 0.002	0.080 $\pm$ 0.005
Stearic C18:0	3.440 $\pm$ 0.073	3.19 $\pm$ 0.02	3.57 $\pm$ 0.98	3.070 $\pm$ 0.065	3.79 $\pm$ 0.03	2.610 $\pm$ 0.021
Oleic C18:1 ω 9	20.40 $\pm$ 1.61	87.39 $\pm$ 1.86	26.11 $\pm$ 1.32	83.20 $\pm$ 2.11	26.39 $\pm$ 1.71	82.19 $\pm$ 1.99
Linoleic C18:2 ω 6	67.65 $\pm$ 0.92	4.13 $\pm$ 0.34	63.30 $\pm$ 2.35	7.24 $\pm$ 0.89	61.58 $\pm$ 1.53	9.10 $\pm$ 0.95
Arachic C20:0	0.250 $\pm$ 0.011	0.290 $\pm$ 0.031	0.2200 $\pm$ 0.0013	0.230 $\pm$ 0.016	0.230 $\pm$ 0.021	0.1400 $\pm$ 0.0054
α -linolenic C18:3 ω 3	0.080 $\pm$ 0.003	0.25 $\pm$ 0.05	0.050 $\pm$ 0.007	0.1100 $\pm$ 0.0003	0.080 $\pm$ 0.004	0.2000 $\pm$ 0.0015
Gondoin C20:1 ω 9	0.120 $\pm$ 0.002	0.260 $\pm$ 0.007	0.1300 $\pm$ 0.0003	0.170 $\pm$ 0.001	0.140 $\pm$ 0.002	0.12000 $\pm$ 0.00023
Begenic C22:0	0.64 $\pm$ 0.05	1.10 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.03	0.92 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.08
Erucic C22:1	0.020 $\pm$ 0.005	0.050 $\pm$ 0.001	0.030 $\pm$ 0.003	0.060 $\pm$ 0.002	0.0200 $\pm$ 0.0001	0.080 $\pm$ 0.004
Docosadiene C22:2	0.020 $\pm$ 0.001	0.030 $\pm$ 0.001	0.050 $\pm$ 0.003	0.460 $\pm$ 0.007	0.040 $\pm$ 0.009	0.050 $\pm$ 0.006
Lignocerin C24:0	0.25 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.03	0.190 $\pm$ 0.002	0.040 $\pm$ 0.001	0.250 $\pm$ 0.004	0.200 $\pm$ 0.001

Note: the data is presented as a mass fraction of fatty acid in % of the sum of fatty acids.

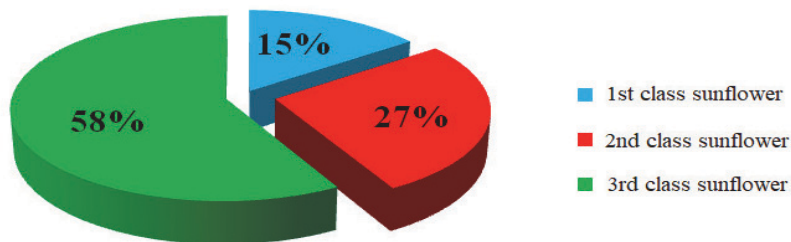


Fig. 1. Class of sunflower seeds, depending on the mass fraction of oil

which corresponds to ordinary oil. Therefore, a significant proportion of sunflower oil produced in Ukraine does not meet the requirements of the current DSTU, since the oleic acid content is higher than 39.4 %. Therefore, the tested oil refers to high oleic.

After analyzing the results of the study of the fatty acid composition of oil sold in Ukraine and received at the ULQSAP in 2017–2019, it can be noted that the highest share of high-oleic sunflower oil was in 2019 (57.14 %), slightly lower - in 2017 (40 %) and the lowest in 2018 (18.8 %).

The trend of high-oleic oil share growth in the Ukrainian market can be explained by the promotion of healthy food, the increased need of the oil industry for new types of oil having the necessary qualities.

Qualitative indicators of sunflower oil are directly dependent on raw materials (sunflower seeds). One of the important indicators of the quality of sunflower seeds is the mass fraction of oil (DSTU 7011: 2009).

According to DSTU 7011: 2009 the mass fraction of oil in terms of dry matter

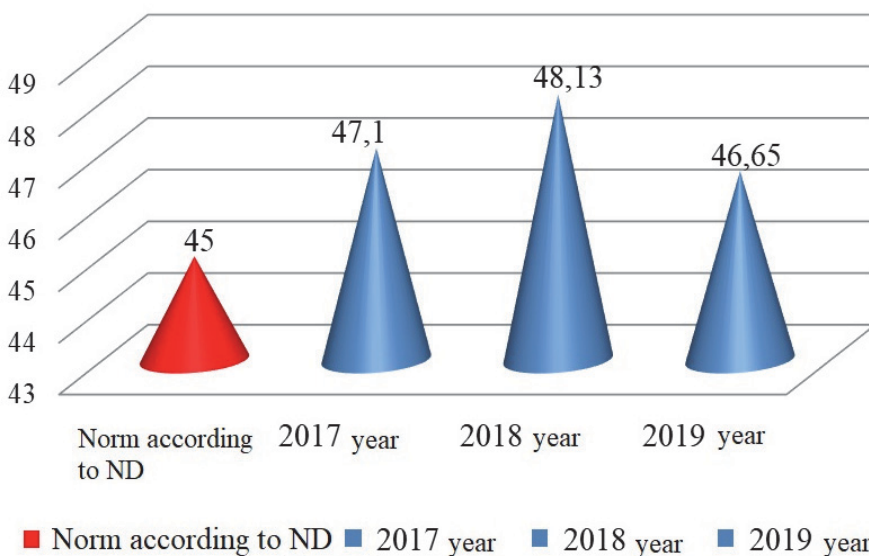


Fig. 2. Mass fraction of oil in seeds and sunflowers in terms of dry matter, %

for the first class of sunflower should be not less than 50,0 %, for the second - not less than 45, for the third class - not less than 40.

During 2019, 33 sunflower seed samples were analyzed for this indicator by the ULQSP AIC. Of these, 58 % were in class 2, 27 % were in class 3 and 15 % were in class 1. The average oil content is 46.65 (Fig. 1, 2). Studies of 78 samples of sunflower seeds in 2018 showed that a larger proportion of the seeds used for oil production are also 2nd class (65.52 %) with an average oil content of 48.13 % (Fig. 2). According to the research of 42 samples of sunflower seeds in 2017, it was found that the majority – 77.14 % of the samples – were classified as 2nd class, with an average oil content of 47.1 % (Fig. 2).

Therefore, in the Ukrainian market, raw materials for the production of oil, mainly belong to the 2nd class. As to the sunflower oil itself, according to its oleic acid content and with average oil yield, the most part of the oil belongs to high oleic. The highest oil content of the second class was in 2018. This is 1 % higher than in 2017 and 1.48 % higher than in 2019. The decrease in sunflower seed oil output in 2019 can be explained by the influence of the soil and climatic conditions of cultivation, since this year there was not enough rainfall throughout the growing season.

Conclusions and further research prospects

An analysis of regulations such as DSTU 4492:2017, GOST 30623-98, CODEX STAN 210-1999 regarding the fatty acid composition of sunflower oil indicates that the current DSTU needs to be amended with respect to the requirements for high oleic oil as for the prevailing product in the Ukrainian market.

The proportion of high-oleic sunflower oil samples received for research at UL-QSAP in 2019 has increased compared to 2018. This confirms the global trend towards increasing the cultivation of sunflower seeds with high oleic acid content.

In Ukraine, sunflower seeds of 2nd class are mainly used for the production of sunflower oil. This shows the need for improving the requirements for the first stage of oil production - growing and obtaining sunflower seeds.

References

- Beam, J., Botta, A., Ye, J. Y., Soliman, H., Matier, B. J., Forrest, M. & Ghosh, S. (2015). Excess Linoleic Acid Increases Collagen I/III Ratio and "Stiffens" the Heart Muscle Following High Fat Diets. *Journal of Biological Chemistry*, 290(38): 23371–23384. doi:10.1074/jbc.M115.682195
- Codex standard for named vegetable oils (CODEX STAN 210-1999). DSTU 4492:2017 Oliia soniashnykova. Tekhnichni umovy. [Sunflower oil. Specifications]. Building Standard. Available at: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=73415
- DSTU 4811:2007 Nasinnia oliinykh kultur [DSTU 4811:2007 Oil seed]. The epicenter of legislation. Available at: <http://epicentre.com.ua/DSTU-4811-2007-nrm3071.html>
- DSTU 7577:2014 Nasinnia oliine vyznachennia vmistu olii metodom ekstraktsii v aparati Soksleta. [DSTU 7577: 2014 Oilseed determination of oil content by extraction method in Soxhlet apparatus]. The epicenter of legislation. Available at: <http://epicentre.com.ua/dstu-7577-2014-nrm27305.html>
- Euralis. Available at: <http://euralis.ua/product-category/sunflower/2020>
- Ghosha, M., Upadhyay, R., Mahato, D. K., & Mishra, H. N. (2019). Kinetics of lipid oxidation in omega fatty acids rich blends of

- sunflower and sesame oils using Rancimat. Food Chemistry, 272: 471–477.
- Ghoshb, M., Upadhyay, R., Mahato, D. K., & Mishra, H. N. (2019). Thermal and oxidative stability assessment of synergistic blends of sunflower and sesame oils tailored for nutritionally stable composition of omega fatty acids. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 135(4): 2389–2398.
- HOST 30418-96 Masla rastytelnye. Metod opredeleniya zhyrnokyslotnoho sostava (Olii roslynni. Metody vyznachennia zhyrnokyslotnoho skladu) [GOST 30418-96 Vegetable oils. Method of determination of fatty acid composition (Vegetable oils. Methods of determination of fatty acid content)]. TechExpert. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/gost-30418-96>. (in Russian)
- HOST 30623-98 Masla rastytelnye y marharynovaia produktsiya. Metod obnaruzheniya falsyfykatsyy [Vegetable oils and margarine products. A method of detecting fraud] TechExpert. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200023036> (in Russian)
- Manzo, N., Santini, A., Pizzolongo, F., Aiello, A., & Romano, R. (2019). Effects of alpha-tocopherol and oleic acid content in sunflower oil subjected to discontinuous and prolonged frying process. Progress in Nutrition, 21(3): 686–692. doi:10.23751/pn.v21i3.7892
- Sanders, T. A. (2014). Conference on 'PUFA mediators: implications for human health' Symposium 1: PUFA: health effects and health claims Protective effects of dietary PUFA against chronic disease: evidence from epidemiological studies and intervention trials. Proceedings of the Nutrition Society, 73(1): 73–79. doi:10.1017/s0029665113003789
- Ukroliya. Available at: https://www.ukroliya.com/uk/main_directions/vysokooleinova-oliia/2020
- Uriho, A., Yang, S. J., Tang, X., Liu, C. S., Wang, S., Cong, Y. & Zhou, P. (2019). Benefits of blended oil consumption over other sources of lipids on the cardiovascular system in obese rats. Food & Function, 10(9): 5290–5301. doi:10.1039/c9fo01353a
- Ushkalov, V. O., Danchuk, V. V., Samkova, O. P., Baranov, Yu. S., Vyhovska, L. M. & Midyk, S. V. (2017). Biologichna bezpeka: rezultaty monitorynhu ahroresursiv, produktsii APK ta kharchovykh produktiv za 2014-2016 roky [Biosecurity: results of monitoring agro-resources, agro-food products and food products for 2014-2016]. Inter-departmental subject scientific collection «Veterinary medicine», 103:88–92. (in Ukrainian)

Ушкалов В.О., Якубчак О.М., Таран Т.В., Мідик С.В., Дудченко Н.Я. (2020). ЩОДО ОКРЕМИХ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ НАСІННЯ СОНЯШНИКУ ТА СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ, ЩО РЕАЛІЗУЄТЬСЯ В УКРАЇНІ. Ukrainian Journal of Veterinary Sciences, 11(2): 53–62, <https://doi.org/10.31548/ujsv2020.02.005>

Анотація. Попит на високоолеїнову соняшникову олію у зв'язку зі зростаючою потребою людства у корисних для здоров'я харчових продуктах як в Україні, так і в світі щороку зростає. Вона має цінні властивості як для виробників, так і споживачів. Отже, встановлення норм щодо жирнокислотного складу насіння соняшника і соняшникової олії стає досить актуальним і важливим. Мета роботи – провести порівняльний аналіз нормативно-правових актів України та міжнародних щодо вмісту жирних кислот у соняшниковій олії; дослідити олію соняшникову та насіння соняшника, що є на ринку України, за окремими показниками якості та встановити частку високоолеїнової олії.

У статті проведено порівняльний аналіз вітчизняних та міжнародних нормативних документів. В чинному ДСТУ 4492:2017 відсутній розподіл соняшникової олії залежно від вмісту олеїнової кислоти. Ця кислота нормується в межах 14,0–39,4 %, що відповідає звичайній олії. За міжнародними вимогами олія соняшникова поділяється на звичайну, із середнім вмістом олеїнової кислоти і високоолеїнову та регламентується більша кількість жирних кислот. Нами проведено визначення жирнокислотного складу насіння соняшника та соняшникової олії, що надходила для досліджень в УЛЯБП АПК впродовж 2017–2019 рр., методом газової хроматографії. Встановлено, що на ринку України в реалізацію надходить значна частка високоолеїнової олії, зокрема, найбільше у 2019 р. (57,14 %), порівняно з 2018 роком (18,8 %) та 2017 (40 %). Це підтверджує світову тенденцію щодо збільшення вирощування сортів соняшнику з високим вмістом олеїнової кислоти в Україні.

Здійснено порівняльний аналіз насіння соняшника щодо масової частки олії за 2017–2019 рр. Встановлено, що за вмістом масової частки олії насіння соняшнику, що використовують для виготовлення олії соняшникової в Україні, відноситься переважно до другого класу.

Ключові слова: жирні кислоти, високоолеїнова олія, насіння соняшнику, олеїнова кислота, масова частка олії

Подано до друку 5 квітня 2020 року

ВИВЧЕННЯ ЕПІДЕМІОЛОГІЧНОЇ СИТУАЦІЇ В УКРАЇНІ ЩОДО БОТУЛІЗМУ

О. Л. КРАВЦОВА, завідувач науково-дослідним відділом мікробіологічних досліджень,

<https://orcid.org/0000-0003-2119-7749>

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

У. М. ЯНЕНКО, кандидат ветеринарних наук, завідувач відділу молекулярно-біологічних, вірусологічних та імунологічних досліджень,

<https://orcid.org/0000-0001-5678-3356>

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ

О. О. МАРЧУК, провідний фахівець,

<https://orcid.org/0000-0002-0213-2942>

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

Н. Г. СОРОКІНА, кандидат ветеринарних наук, доцент, кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи,

<https://orcid.org/0000-0003-3279-7344>

Національний університет біоресурсів і природокористування України,

Н. І. КОС'ЯНЧУК, кандидат ветеринарних наук, доцент, кафедри гігієни тварин та санітарії ім. проф. А. К. Скороходька,

<https://orcid.org/0000-0002-3055-8107>

Національний університет біоресурсів і природокористування України,

Г. А. ЗАВІРЮХА, кандидат сільськогосподарських наук, завідувач відділу мікробіології,

<https://orcid.org/0000-0002-46028477>

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ

E-mail: oksana759@ukr.net, ulyanakuzyk@ukr.net, olga_vira@ukr.net, nso-rokina26@gmail.com, ninaiva2@ukr.net, annazavir@gmail.com

Анотація. У статті описано аналіз результатів досліджень харчових продуктів, кормів для тварин, патологічного матеріалу від тварин, проведених державними лабораторіями ветеринарної медицини на наявність збудника ботулізму та ботулінічного токсину в 2014 – 2018 роках в Україні.

Мета дослідження – вивчення епідеміологічної ситуації щодо ботулізму серед людей і тварин, виявлення збудника ботулізму та ботулінічного токсину в продуктах харчування та кормах в Україні за період з 2014 по 2018 рік, постановка біологічного аналізу з наступним визначенням типу токсину, а також встановлення джерела збудника та причин зараження ботулотоксином.

Матеріалами дослідження стали результати щорічної державної статистичної звітності з мікробіологічних досліджень, проведених державними лабораторіями Держпродспоживслужби України, та результати власних досліджень, отриманих бактеріологічним відділом Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи за період з 2014 по 2018 рік.

За 5 років 645 людей постраждали від ботулізму. Померло – 46, що становить 7,1 % від загальної кількості хворих.

За 5 років державними лабораторіями Держпродспоживслужби України було обстежено 9954 проби, що становить 23,2 % від загальної кількості досліджуваного матеріалу, а патологічного матеріалу – 635 проб, що відповідно склало 6,4 %. Було отримано 7 позитивних результатів.

Через кількість летальних випадків серед населення України, які зростають, питання про ботулізм стає все більш актуальним. Джерелом зараження може бути їжа як домашнього виробництва, так і промислового виготовлення.

Ключові слова: *Cl. botulinum*, ботулінічний токсин, токсикоз, продукти харчування, патологічний матеріал

Актуальність

Ботулізм – це важке харчове отруєння, зумовлене споживанням продуктів, що містять ботулотоксини. Збудник хвороби розмножується в анаеробному стані (без доступу кисню) за невправильних умов зберігання чи транспортування продуктів харчування. У МОЗ рекомендують утримуватися від вживання їжі, про якість якої споживачу достеменно невідомо. Зрідка трапляється раневий ботулізм, ботулізм дітей раннього віку та аерозольний (внаслідок вдихання збудника) (Всесвітня організація охорони здоров'я, 2018).

Збудник захворювання — *Clostridium botulinum* – анаероб, природне місце локалізації якого шлунково-кишковий тракт людини, тварин і риб; у зовнішнє середовище потрапляє з випорожненнями. Є дві форми існування збудника: вегетативна та спорова.

Вегетативні форми нестійкі: кип'ятіння знищує їх за 10–15 хв. Концен-

трація солі більше 15% та цукру вище 50% пригнічує розмноження збудника. Завдяки спороутворенню збудник ботулізму в процесі еволюції пристосувався до виживання у несприятливих умовах навколишнього середовища та зберіг спадкову інформацію. Спори *Clostridium botulinum* стійкі до багатьох бактерицидних речовин: 20%-ий розчин формаліну знешкоджує їх за 24 години; етиловий спирт – за 2 місяці; 10%-ний HCl знищує їх лише через 1-у годину. Спори залишаються життєздатними після 4–5-годинного кип'ятіння, тривалий час зберігаються за 18% концентрації кухонної солі, проявляють стійкість до заморожування, висушування та ультрафіолетового опромінення (Kolesnikov, 2015), і у такому стані можуть знаходитися сотнями років, що і є їх головною загрозою.

За сприятливих умов (відсутність кисню, аутоліз клітини) спори переходять у вегетативну форму і збудник набуває своїх летальних проявів:

виділяє токсин, що існує у вигляді протоксину та токсину. Протоксин потрапляє з їжею до шлунку, під дією трипсину та панкреатину перетворюється в ботулінічний токсин і вже в активному стані всмоктується в кишківнику (Tryxlib, 2016).

Слід зауважити, що ботулінічний токсин є одним із найсильніших у природі складним білком, синтезованим живим організмом. На 30–40 % подібний до тетанотоксину, він має дещо схожий з ним механізм дії на живий організм. Летальна доза для людини становить 0,3 мкг.

Токсин *Clostridium botulinum* термолабільний: руйнується за кип'ятіння впродовж 10–15 хв, а за 80°C – 30 хв; стійкий до дії пепсину та трипсину. Токсин всмоктується в шлунково-кишковому тракті, через ентероцити потрапляє в кров, вражає ядра довгастого мозку та викликає судинні розлади. Це є причиною крововиливів, застою і тромбозу капілярів. Ботулінічний токсин блокує мотонейрони спинного й довгастого мозку, периферійні мотонейрони, припиняє передачу імпульсу від нервового закінчення до м'язів, що і призводить до розвитку паралітичного синдрому, спричиняє розслаблення мускулатури, зниження м'язового тону, внаслідок чого настає асфіксія та смерть (Sobel, 2017).

Залежно від виду ботулінічного токсину штами збудника диференціюють на 7 типів: A, B, C1, D, E, F та G. За останні 20 років спалахи харчового ботулізму в людей здебільшого обумовлені токсином типу A, а також B та E (Osnat Rosen, 2015). Токсини типів C, D та E викликають захворювання у тварин та птахів, зокрема, водоплавних. Ботулінічний токсин типу F визначається вкрай рідко. В 15% випадків встановити тип токсину не вдалося.

Люди заражаються ботулізмом під час вживання продуктів харчування, що контаміновані життєздатними клостридіями або їх спорами. Це можливо за умов виготовлення продуктів з порушенням технологічного процесу виробництва. За даними ВООЗ, саме консервовані або ферментовані в домашніх умовах харчові продукти є основним джерелом харчового ботулізму. Ботулінічний токсин діагностується у таких харчових продуктах: консервованих овочах (зелена квасоля, шпинат, буряк); у консервованому тунці, у в'яленій, солоній, копченій рибі; у м'ясних продуктах (шинка, сосиски, ковбаса). Є випадки, коли ботулінічний токсин виявляють у продуктах промислового виробництва, а саме, у вакуумних упаковках (Tryxlib, 2016).

Зараження тварин відбувається під час вживання неякісного рослинного корму та м'ясного фаршу, а також через хворих гризунів.

Фактори передачі збудника – інфіковані корми; м'ясо забитих тварин, туші яких пролежали нерозібраними кілька годин; трупи гризунів, у кишківнику яких унаслідок анаеробних умов відбулось накопичення токсину, м'ясні консерви для годівлі собак та котів (Реск, 2011).

Варто зазначити, що уражені продукти та корми органолептично не відрізняються від якісних. Збудник і токсин можливо виділити лише за проведення лабораторних досліджень (Botulism – Medical News Today, 2018).

Метою роботи було вивчення епідеміологічної ситуації щодо поширення ботулізму серед людей та тварин, виявлення збудника ботулізму та ботулінічного токсину в харчових продуктах і кормах для тварин на території України за період з 2014

по 2018 роки, та постановка біопроби з наступним встановленням типу токсину; а також встановлення джерела збудника та причини виникнення ботулотоксикоінфекції.

Матеріали і методи досліджень

Матеріалами слугували висновки щорічної державної статистичної звітності щодо мікробіологічних досліджень, проведених державними лабораторіями ветеринарної медицини України та результати власних досліджень, одержані бактеріологічним відділом Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи з 2014 по 2018 роки, а також статистичні дані МОЗ України стосовно захворюваності на ботулізм серед населення України та кількості летальних випадків.

Виділення *Cl. botulinum*, ботулінічного токсину та протоксину з харчових продуктів і кормів проводили згідно ДСТУ 6042:2008 «Продукти харчові. Методи виявлення ботулінічних токсинів і *Clostridium botulinum*»; ГОСТ 30425-97 «Консерви. Метод визначення промислової стерильності»; «Методичних рекомендацій щодо бактеріологічного аналізу кормів для тварин 2014 року»; «МВ з санітарно-мікробіологічного контролю виробництва продукції з риби та інших водних живих ресурсів»; ДСТУ 7469:2013 «Борошно кормове тваринного походження. Методи бактеріологічного аналізу».

Патологічний матеріал досліджували згідно методичних вказівок «Лабораторна діагностика ботулізму», 2002 рік.

Під час виконання роботи застосовували мікробіологічні методи: виділення збудника, визначення його культурально-морфологічних, біохімічних властивостей. Виявлення ботуліністичного токсину і протоксину проводили методом постановки біопроби на лабораторних тваринах.

Результати досліджень та їх обговорення

Ботулізм серед людей за останні 5 років зареєстровано у 19 областях України: Закарпатській, Львівській, Волинській, Івано-Франківській, Чернівецькій, Тернопільській, Житомирській, Вінницькій, Київській, Чернігівській, Черкаській, Одеській, Кіровоградській, Полтавській, Сумській, Херсонській, Запорізькій, Харківській, Донецькій.

За даними МОЗ, у 2014 році на ботулізм захворіли 178 людей, з яких 9 померло. Впродовж 2015 року захворіло 139 осіб, з яких шестеро людей померло. У 2016 році налічувалося 119 випадків, серед яких 12 – летальних. Натомість, у 2017 році зафіксовано 112 випадків харчових отруєнь, викликаних ботулізмом, 11 з яких смертельні. За 2018 рік в Україні зареєстровано 97 постраждалих від ботулізму, померло – 8.

Кількість випадків захворюлих, померлих від ботулізму за дослідний період представлено на рис. 1.

З представлених результатів видно, що офіційно високий показник захворювання припадає на 2014 рік – 178 випадків. Висока смертність реєструвалася у 2016 році – 12 випадків.

За офіційними даними за 5 років було зареєстровано 645 людей, хворих на ботулізм. Померло – 46, що становить 7,1 % від загальної кілько-

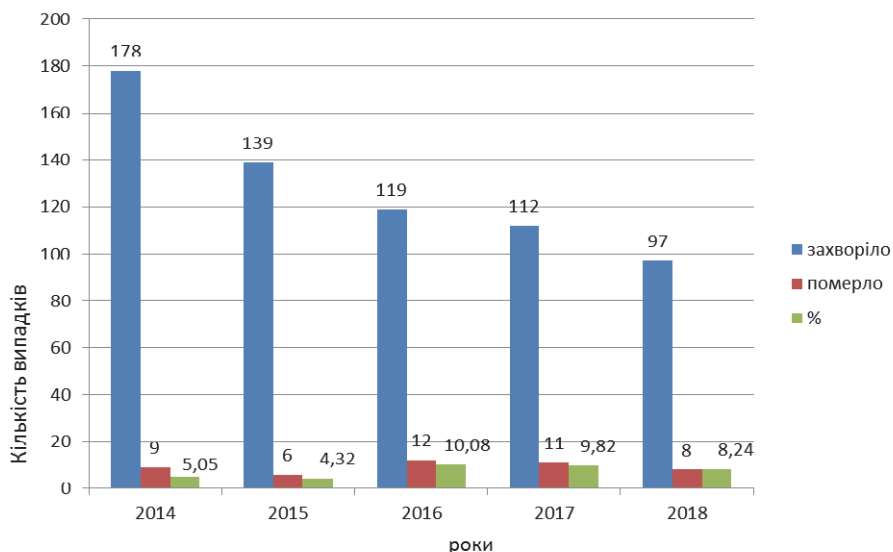


Рис. 1. Кількість захворілих людей та летальних випадків в Україні у 2014–2018 рр.

сті захворілих. Зазначимо, що в даному випадку наведені саме офіційні дані. У цілому ж кількість захворілих та померлих може дещо відрізнятись, бо зафіксовані лише ті випадки, за якими були звернення до медичних закладів або внаслідок виклику невідкладної допомоги й подальшого підтвердження діагнозу.

Найбільша кількість людей захворіла через вживання рибних продуктів. Також причиною зараження були м'ясні, овочеві й грибні консерви. Заражені харчові продукти здебільшого виготовлені в домашніх умовах, в місцях несанкціонованої торгівлі та невідомого походження.

Фахівцями державних лабораторій Держпродспоживслужби України щороку проводяться дослідження патологічного матеріалу від хворих та загинув тварин. Харчові продукти й корми також аналізують на наявність збудника ботулізму та ботулінічного токсину.

У 2014 році проведено 1313 досліджень харчових продуктів, кормів та патологічного матеріалу на наявність збудника ботулізму та ботулінічного токсину. З них – 428 консерви рибні та м'ясо-рослинні, що становить 32,6% від загальної кількості дослідженого матеріалу, 799 (60,9%) – корми для тварин (60,9%) та 86 (6,6%) – зразки патологічного матеріалу. Позитивних результатів не виявлено.

У 2015 році проведено 2232 дослідження. З них 123 (5,5% від загальної кількості) – зразки консервів рибних та м'ясо-рослинних; 2001 (89,7%) зразок кормів для тварин та 108 (4,8%) зразків патологічного матеріалу. Позитивних результатів не було виявлено.

Впродовж 2016 року досліджено 2754 зразки харчових продуктів, кормів та патологічного матеріалу, отриманого від тварин, на наявність збудника ботулізму та ботулінічного токсину. З них: 851 дослідження (30,9% від

усієї кількості) – консерви рибні та м'ясо-рослинні; 1629 (59,2 %) – кормів для тварин та 274 (4,8 %) – зразків патологічного матеріалу. Позитивні результати виявлено в 2 випадках (патологічний матеріал від коней); це становило 0,07 % від загальної кількості проведених досліджень.

За 2017 рік було проведено 1945 досліджень. З них: 246 консервів рибних та м'ясо-рослинних – 12,6%; риби сушеної та в'яленої 138 зразків – 7,1%; м'яса в вакуумній упаковці – 2 зразки – 0,1%; 1452 зразки кормів для тварин – 74,7% та 106 зразків патологічного матеріалу, що становило 5,45 %. Позитивні результати були виявлені в 5 випадках (риба сушена/в'ялена), що склало 0,26 % від загальної кількості досліджених зразків. Були виділені токсини типу А, В, Е та протоксин типу А.

Біопробу щодо виявлення ботулінічного токсину (рис. 2) й протоксину проводили на лабораторних тваринах на базі віварію Державного науко-



Рис. 2. Біопроба на білих мишах щодо виявлення ботулізму

во-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ). У білих мишей було чітко визначено клінічні прояви захворювання з характерною ознакою, яка вказувала на ботулізм.

Характерна клінічна ознака в лабораторної тварини, що загинула від ботулізму, є, так звана, “осина талія”.

Впродовж 2018 року державними лабораторіями ветеринарної медицини України було досліджено 1710 зразків для виявлення збудника ботулізму та його токсину, а саме: 661 (38,6 %) – консервів рибних та м'ясо-рослинних: 38 зразків – риби сушеної та в'яленої (2,2 %); риби свіжої – 1 зразок (0,06 %); ікри замороженої – 2 зразки (0,1 %); м'яса у вакуумній упаковці – 1 зразок (0,1%), 947 зразків кормів для тварин (55,4 %) та 61 зразок патологічного матеріалу, що становило 3,6 % від загальної кількості зразків харчових продуктів, кормів та патологічного матеріалу. Позитивних результатів виявлено не було (табл.1, рис.3).

Згідно проведених досліджень та розслідувань за минулі роки, найчастіше *Cl. botulinum* виділяли з корму для тварин (рис. 3) та непатраної в'яленої прісноводної риби, виготовленої приватними особами із недотриманням технологічного процесу та санітарно-гігієнічних вимог.

Як видно з вище наведених даних (табл. 1), за 2014–2016 рр. дослідженню підлягали: консерви рибні та м'ясо-рослинні, корми та патологічний матеріал. У 2017 р. внаслідок збільшення кількості випадків ботулізму серед людей до вище вказаних досліджень додали рибу сушену, в'ялену, напівфабрикати у вакуумній упаковці. З 2018 року, окрім зазначених дослідних об'єктів досліджували свіжу

1. Результати досліджень харчових продуктів, кормів та патологічного матеріалу від тварин на наявність збудника ботулізму та ботулінічного токсину за п'ять років

Рік	Кількість досліджень											Пози- тивний результат	
	Всього	Консерви рибні, м'ясо- рослинні		Корми для тварин		Патматеріал		М'ясо у вакуумній упаковці		Риба сушена та в'ялена			
		к-ть	%	к-ть	%	к-ть	%	к-ть	%	к-ть	%	к-ть	%
2014	1313	428	32,6	799	60,9	86	6,6	—	—	—	—	—	—
2015	2232	123	5,5	2001	89,7	108	4,8	—	—	—	—	—	—
2016	2754	851	30,9	1629	59,2	274	4,8	—	—	—	—	2	0,07
2017	1945	246	12,6	1452	74,7	106	5,4	2	0,1	138	7,1	5	0,26
2018	1710	661	38,6	947	55,4	61	3,6	1	01	38	2,2	—	—

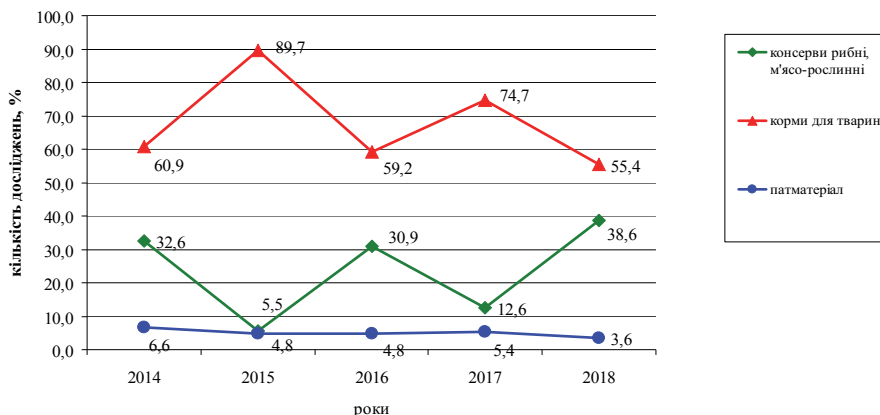


Рис. 3. Частота виділення збудника ботулізму та ботулінічного токсину від дослідного матеріалу за період 2014–2018 рр.

та заморожену рибу. Найбільший відсоток досліджуваного матеріалу відведено кормам для тварин, консервам рибним і м'ясо-рослинним.

За 5 років державними лабораторіями ветеринарної медицини України було досліджено 9954 зразків різних видів матеріалу: консервів рибних та м'ясо-рослинних – 2309, що становить 23,2 % від загальної кількості дослідженого матеріалу, риби сушеної/в'яленої – 76 (1,8 %), м'яса у

вакуумній упаковці 3 (0,03 %); риби свіжої 1(0,01 %), ікри замороженої 2 зразки (0,02 %); кормів для тварин 6828 (68,6 %) та патологічного матеріалу 635 (6,4 %) зразків. Виявлено 7 позитивних випадків із них: 2 з патологічного матеріалу від коней та 5 з риби сушеної/в'яленої що становило 0,07 % від загальної кількості дослідженого матеріалу.

Відповідно до чинних нормативних документів дослідження на боту-

лізм та токсин не регламентуються, а здійснюються лише за перевірки консервованих продуктів на промислову стерильність. Дослідження рибних продуктів проводиться на сульфїтредукуючі клостридії. Оскільки рутинні методи дослідження на вище згаданий показник згідно ГОСТ 30425-97 значно відрізняються від методу виявлення *Cl. botulinum*, дані бактерії виділяють рідко. Так, за 2014–2016 рр. збудник ботулізму не було виявлено під час дослідження м'ясо-рослинних продуктів та кормів для тварин. Проте коли у 2017 році збільшилася кількість цілеспрямованих досліджень на виявлення *Cl. botulinum* та його токсину внаслідок проведення розслідувань після летальних випадків у людей від отруєнь, кількість позитивних випадків збільшилась.

Отже, проведені нами узагальнення та дослідження стосовно виявлення збудника ботулізму та ботулінічних токсинів, які призводять до отруєнь людей і навіть до летальних випадків, свідчать про те, що питання ботулізму потребує вирішення. На території України необхідно впровадження інформаційно-роз'яснювальної роботи серед населення, а в разі виникнення захворювання — застосування своєчасних ефективних діагностичних та лікувальних заходів.

Висновки і перспективи

За останні 5 років в Україні зареєстровано 645 людей з діагнозом отруєння, причиною яких був ботулінічний токсин; 46 випадків із них закінчилося летально, що становить 7,1 % від загальної кількості захворілих.

Джерелом збудника інфекції можуть бути продукти домашнього виробництва і харчові продукти

промислового виготовлення. Аналіз дослідного матеріалу за період 2014–2018 рр. виявив 7 позитивних випадків щодо ботулізму та ботулінічного токсину, із них: 2 – з патологічного матеріалу від коней та 5 – з риби сушеної/в'яленої, що становило 0,07 % від загальної кількості.

Перспективою наших досліджень є розробка методичних рекомендацій щодо виявлення ботулінічного токсину та впровадження їх в роботу мікробіологічних лабораторій для спрощення проведення моніторингових досліджень з метою забезпечення благополуччя щодо токсикозу викликаного *Cl. botulinum*.

References

- Aktualna infektolohiya. Medicine and Pharmacy News. Available at: <http://www.dsesu.gov.ua/ua/dses-ua/novyny/item/1247>.
- Botulism: What is it and how can we prevent it? Available at: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/173943>.
- Botulizm v Ukraini: prychny, symptomy ta profilaktyka. Available at: https://24tv.ua/health/botulizm_v_ukrayini_simptomi_prichini_i_karta_poshirennya_n829284.
- Kolesnikov, A. V., Ryabko, A. K., Shemyakin, I. G. & Kozyr, A. V. (2015). Sovremennyye podkhody k razrabotke specificheskoy terapii osobo opasnykh toksikoinfektsiy [Modern approaches to the development of specific treatment of especially dangerous toxic infections]. Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences, 4:428–434. (in Russian)
- Osnat Rosen, Liron Feldberg, Sigalit Gura, Tal Brosh-Nissimov & Alex Guri Early. (2015) Real-Time Medical Diagnosis of Botulism by Endopeptidase-Mass Spectrometry. Clinical Infectious Diseases, 61 (12): 58–61.
- Peck, M. W., Smith, T. J., Anniballi, F., Austin, J. W., Bano, L. & Bradshaw, M. (2017). Histor-

- ical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins* (Basel), 9(1):38.
- Sobel, J. & Rao, A. (2017). Making the best of the evidence: towards national clinical guidelines for botulism. *Clin Infect Dis.*— Dec 27; 66(1):1–3.
- Tryhlib, V. I., Palatna, L. O., Vygovska, O. V., Trohimovych, L. P. & Arsentieva, N. V. (2016). Botulizm: osoblyvosti perebihu. Vypadky z pra, ktyky [Botulism: features of the course. Case studies]. *Novosti medycyny i farmacii*, 12:588. (in Ukrainian)
- Vsesvitnia organizatsia okhorony zdorovia. Europe Regional Bureau. [World Health Organization Europe Regional Bureau]. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>.
-

Kravtsova O. L., Yanenko U. M., Marchuk O. O., Sorokina N. H., Kosyanchuk N. I., Zaviryukha G. A. (2020). RESEARCHES OF EPIDEMIC AND EPISOOTIC SITUATION IN UKRAINE ON BOTULISM. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 11(2): 63–71, <https://doi.org/10.31548/ujvs2020.02.006>

Abstract. *The media are worried, cases of poisoning people with botulism have become more frequent. The article describes the analysis of the results research food products, feed for animals, pathological material from animals, carried out by the state laboratories of veterinary medicine for the presence of a pathogen of botulism and botulinum toxin in the 2014 - 2018 years in Ukraine.*

Goal: to study the epidemic and epizootic situations of the spread of botulism among people and animals, to identify the causative agent of botulism and botulinum toxin in food and animal feed in Ukraine for the period from 2014 to 2018, staging a bioassay with the subsequent determination of the type of toxin; as well as establishing the source of the pathogen and the causes of botulinum toxin infection.

Materials and methods. Results of the annual state statistical reporting on microbiological research carried out by the state laboratories of veterinary medicine of Ukraine and the results of their own research obtained by the bacteriological department of the State Research Institute for Laboratory Diagnosis and Veterinary and Sanitary Expertise in the period from 2014 to 2018.

Results. For 5 years 645 people have suffered from botulism. Died 46, which is 7.1 % of the total number of patients.

For 5 years, the state laboratories of veterinary medicine examined 9954 samples which is 23.2 % of the total amount of investigated material, and pathological material 635 samples that made 6,4 %, respectively. 7 positive results were obtained.

According to conducted research Cl.botulinum most often isolated from stockfish.

Conclusions. Due to the increasing number of fatalities among the population of Ukraine, the issue of botulism is becoming more urgent. Over the past 5 years, 645 people have been diagnosed with botulism, 46 of which have been fatal, accounting for 7.1 % of the total number of patients.

The source of infection can be home-produced and industrial-grade food. The analysis of the study material for the period 2014 - 2018 revealed 7 positive cases of botulism and butulinic toxin.

There is a need to introduce systematic controls on food and feed produced by small businesses.

Keywords: *Cl. botulinum, botulinum toxin, toxic infection, food, pathological material*

Подано до друку 18 лютого 2020 року

ОГЛЯД

УДК: 636.09 : 611.018.51/.52

<https://doi.org/10.31548/ujvs2020.02.007>

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА І ТЕРМІНОЛОГІЯ КЛІТИН ЕРИТРОЇДНОГО РЯДУ

Н. І. БОЙКО, кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри терапії і клінічної діагностики,

<https://orcid.org/0000-0001-9954-4099>

Г. В. БОЙКО, кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри фармакології та токсикології,

<https://orcid.org/0000-0001-6907-9325>

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: boyko_ni@nubip.edu.ua ; boiko_gv@nubip.edu.ua

Анотація. Першою морфологічно розпізнаваною клітиною еритроцитопоезу є еритробласт. У процесі дозрівання еритроцитів від еритробласта до зрілої клітини проходять такі основні зміни: базофілія цитоплазми клітини (зумовлена наявністю значного вмісту РНК у рибосомах) змінюється спочатку поліхроматофілією, а потім (унаслідок збільшення вмісту гемоглобіну і зменшення кількості РНК та втратою усіх органел) оксифілією; ядро ущільнюється, пікнотизується і виштовхується з клітини; розміри клітини у процесі диференціації зменшуються від 15–25 до 7–8 мкм.

За аналізу постнатального еритроцитопоезу в нормі та за патології з метою отримання достовірної інформації необхідно до офіційних назв клітин цього процесу додавати назви їх синонімів, які використовують вітчизняні та зарубіжні гематологи. Узагальнюючи термінологію клітинних елементів постнатального еритроцитопоезу тварин на основі їх морфологічної специфіки можна представити її наступним чином: 1. Еритробласт (синоніми – проеритробласт, рубрібласт) → 2. Пронормобласт (синоніми – пронормоцит, прорубріцит) → 3. Нормобласт базофільний (синоніми – нормоцит базофільний, рубріцит базофільний) → 4. Нормобласт поліхроматофільний (синоніми – нормоцит поліхроматофільний, рубріцит поліхроматофільний) → 5. Нормобласт оксифільний (отрохроматичний) (синоніми – нормоцит оксифільний (отрохроматичний), метарубріцит) → 6. Ретикулоцит → 7. Зрілий еритроцит.

За фізіологічних умов потреба в еритроцитах забезпечується за рахунок посиленого розмноження поліхроматофільних нормобластів. Якщо потреба організму

в еритроцитах зростає (наприклад, у разі крововтрат), нормобласти починають розвиватися із попередників, а останні – зі стовбурових кровотворних клітин.

До поділу здатні клітини IV класу (еритробласт, проеритробласт, нормобласт базофільний і крупні молоді клітини нормобласта поліхроматофільного). Клітини V класу (нормоцит оксифільний і ретикулоцити кісткового мозку та крові) не мають здатності до поділу, вони лише дозрівають. Процес гемоглобінізації в клітинах еритроїдного ряду розпочинається в базофільних нормобластах і завершується в ретикулоцитах. В зрілих еритроцитах (VI клас клітин) процес утворення гемоглобіну не відбувається.

Ключові слова: еритроцитопоез, еритробласт, проеритробласт, проеритробласт, прорубріцит, нормобласт, нормоцит, рубріцит, метарубріцит, ретикулоцит, еритроцит, гемоглобінізація в клітині

Актуальність

Науково-технічні досягнення останніх 20 років в області молекулярної біології і генетики збагатили наші знання про молекулярні механізми розвитку кровотворення, патогенез онкогематологічних і спадкових хвороб, а також хвороб пов'язаних з порушенням гемостазу. Тому, сучасна гематологія – це медицина високих технологій, що дозволяє ефективно виявляти і лікувати хвороби крові.

Протягом декількох десятиліть як модель для вивчення кровотворення в людини інтенсивно вивчалось ембріональне, фетальне і постнатальне кровотворення у лабораторних тварин (особливо мишей), тому гематологічні дослідження в гуманній і ветеринарній медицині дуже тісно переплітаються. Лікарі ветеринарної медицини сьогодні мають доступ до значних об'ємів наукових праць, які присвячені вивченню порушення кровотворення, виникненню анемічного стану чи появи злоякісних захворювань органів кровотворення. Ця інформація викладена у різних джерелах (тезах доповідей, статтях, монографіях) мовами різних країн. Дуже

багато інформації про гематологічні дослідження написані англійською мовою. Однак, під час аналізу цих праць виникають труднощі в розумінні термінології за опису клітин крові. Зокрема, це стосується назв клітин-попередниць еритроцитів у процесі постнатального еритроцитопоезу.

Мета дослідження – проаналізувати літературні джерела і максимально уточнити термінологію клітинних елементів постнатального еритроцитопоезу у ссавців на основі їх морфологічної специфіки.

Матеріали і методи дослідження

Матеріалом для досліджень були підручники, посібники і гематологічні атласи гуманної і ветеринарної медицини, у яких описані особливості еритроцитопоезу.

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що постнатальний еритроцитопоез (розвиток еритроцитів після народження) ссавців відбува-

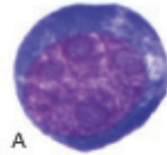
ється в червоному кістковому мозку. Джерелом розвитку еритроцитів (як і лейкоцитів та тромбоцитів) є стовбурова кровотворна клітина (СКК), яку відносять до клітин I класу гемопоезу. Ця клітина здатна до поділу. Під впливом стромального кісткомозкового специфічного мікрооточення вона ділиться і диференціюється у клітину II класу – клітину попередника мієлопоезу (розвиток клітин крові у червоному кістковому мозку). Клітина гемопоезу II класу частково детермінована, з неї можуть утворитися лише клітини мієлоїдного ряду. Клітина II класу має назву КТО-ГЕММ (колонієутворююча одиниця гранулоцитів, еритроцитів, моноцитів і мегакаріоцитів). Клітина цього класу ще має назву НСК (напівствбурова клітина). Із клітини КТО-ГЕММ утворюються два види більш детермінованих клітин-попередників – КТО-ГнЕ (колонієутворююча одиниця гранулоцитів та еритроцитів) і КТО-МГЦЕ (колонієутворююча одиниця мегакаріоцитів та еритроцитів). Таким чином, уніпотентний попередник еритроцитів (КТО-Е) (клітина III класу, що розвивається лише в напрямку еритроцитів) може утворитися двома шляхами – з КТО-ГнЕ або КТО-МГЦЕ. Уніпотентну еритропоетичну клітину ще називають еритропоетинчутливою (ЕЧК), оскільки її наступна диференціація індукується еритропоетином – гормоном, що виробляється у нирках і посилює проліферацію ЕЧК та їх перетворення у еритробласти. Еритропоетин стимулює також розмноження і дозрівання клітин еритроїдного ряду наступних стадій.

Клітини I, II і III класу за своїми морфологічними ознаками дуже подібні і майже не мають відмінностей як між собою, так і з лімфоїдними кліти-

нами (неподільними резервними клітинами) та більшістю бластних клітин (проліферуючих клітин). Розрізнити їх між собою та визначити їх кількість можливо лише за допомогою спеціальних методів дослідження: утворення колоній у культурі, виявленні диференціюючих (CD) антигенів, хромосомних маркерів (Bazarnova, 1982; Tretiak, 2005; Kamyschnikov et al., 2011; Mazurkevych et al., 2014). Розходжень щодо термінології цих клітин у літературних джерелах ветеринарної і гуманної медицини ми не виявили, як не виявили і у працях відомих американських і європейських гематологів (Heilmeger et al., 2005; Anderson, 2007; Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Kaushansky et al., 2010; Mary Anna Thrall et al., 2012).

Еритробласти

(відносяться до IV класу клітин) – перші морфологічно розпізнавані клітини еритроцитопоезу, що мають великий



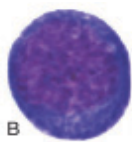
розмір (діаметр клітини 15–25 мкм) та круглу форму. Ядро у цих клітин – велике, кругле, розташоване центрально, має ніжну дрібносітчасто-зернисту структуру (під час фарбування мазків в результаті фіксації фарби в місцях переплетення тонких хроматинових ниток утворюється дрібнозернистий рисунок). Всередині ядра міститься 1–3 (до 5) голубувато-синього кольору ядерець. Цитоплазма у еритробластів представлена у вигляді вузького обідка, фарбується інтенсивно базофільно, може бути злегка пористою та мати відростки. У цитоплазмі клітини відсутня зернистість. Поблизу ядра є світла зона (перинуклеарна), багато рибосом, невелика центросома з двома центрі-

олями, характерною є наявність зерен феритину (комплекс білка із залізом). Еритробласти мають здатність до поділу і диференціації у пронормобласти (пронормоцити).

У англomовних виданнях ветеринарних гематологів еритробласти називають рубрібласти (rubriblast) (Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Mary Anna Thrall et al., 2012).

Хоча, значна частина авторів (Nikitin, 1956; Kudryavtsev and Kudryavtseva, 1974; Abramov, 1985; Dudok et al., 2001; Lutsyk et al., 2003; Heilmeger et al., 2005; Kaushansky et al., 2010; Khomych et al., 2019) називали і називають еритробласти проеритробластами.

Щодо термінології наступних клітин еритроцитопоезу єдиної думки немає (табл. 1). В лабораторній медичній і ветеринарній практиці їх прийнято називати нормобластами, оскільки ці клітини-попередниці мають ядро, а зрілі еритроцити – називають нормоцитами (Nikitin, 1956; Kudryavtsev and Kudryavtseva, 1974; Bazarnova, 1982). Воробйов А.І. у своїй схемі кровотворення (1991 р.) нормоцитами називає не зрілі еритроцити, а нормобласти (Tretiak, 2005). Зараз у медичній лабораторній практиці часто вживають не однакові (часто подвійні) назви цих клітин, що затруднює розуміння еритроцитопоезу (Abramov, 1985; Levchenko et al., 2004; Anderson, 2007; Kamyshnikov et al., 2011).



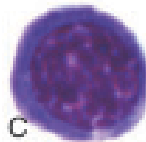
Пронормобласт (пронормоцит). За своїми морфологічними характеристиками ця клітина дуже подібна до еритроб-

ластів, однак має менший розмір (діаметр клітини 12–18 мкм). Форма кліти-

ни також кругла, іноді злегка овальна. Ядро в клітині розміщене центрально (іноді незначно ексцентрично), але має дещо крупносічасту структуру хроматину. Ядерець в ядрі цієї клітини не візуалізують. Цитоплазма пронормобласта (пронормоцита) фарбується інтенсивно базофільно. Між ядром і цитоплазмою є перинуклеарна зона просвітлення. При підрахунку пунктів кісткового мозку цю клітину часто відносять в одну групу з еритробласти (внаслідок важкого диференціювання). Пронормобласт (пронормоцит) також має здатність до поділу і диференціювання в нормобласт (нормоцит), дехто називає цю клітину еритробластом. У англomовних виданнях ветеринарних гематологів пронормобласти (пронормоцити) називають про-рубріцитами (prorubricytes) (Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Mary Anna Thrall et al., 2012).

Однак, багато авторів (Nikitin, 1956; Kudryavtsev & Kudryavtseva, 1974; Dudok et al., 2001; Lutsyk et al., 2003; Kaushansky et al., 2010; Khomych et al., 2019), які описують постнатальний еритроцитопоез у ссавців таку клітину в окрему групу не виокремлюють.

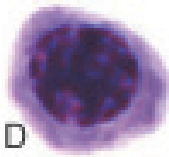
Нормобласти (нормоцити) диференціюються за ступенем насичення їх гемоглобіном на базофільні, поліхроматофільні і оксифільні (ортохроматичні) (Rigan, 2000; Kamyshnikov et al., 2011).



Нормобласт (нормоцит) базофільний – найбільша серед нормобластів за розміром клітина (в діаметрі 10–14 мкм). Ядро

у цих клітин велике, кругле, займає основну частину клітини. Структура

хроматину ядра більш крупна (груба), ніж у попередніх клітин еритроїдного ряду. Хроматин глибокий, розміщується у вигляді видовжених грудочок, відмічається чергування темних і світлих ділянок, що приводить до колесоподібного вигляду ядра (як спиці в колесі). Цитоплазма у вигляді вузького обідка інтенсивно базofilна (внаслідок великої кількості РНК), іноді може мати виступи. У цих клітинах розпочинається синтез гемоглобіну. Гемоглобін перш за все накопичується у перинуклеарній зоні. Цитоплазма починає сприймати кислий барвник еозин і в такому випадку перинуклеарна зона просвітлення може мати рожеватий відтінок, що свідчить про процес гемоглобінізації у клітині. Одночасно з гемоглобінізацією цитоплазми відбувається ущільнення хроматинової сітки ядра, що призводить до утворення крупних глибок (грудочок) і чергування темніших і світліших ділянок. Нормобласти (нормоцити) здатні до поділу, тому, нагромадивши певну кількість гемоглобіну, діляться і диференціюються у нормобласти (нормоцити) поліхроматофільні. У англomовних виданнях ветеринарних гематологів нормобласти (нормоцити) базofilні називають базofilними рубріцитами (basophilic rubricytes) (Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Mary Anna Thrall et al., 2012).

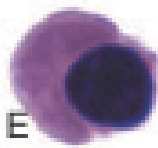


Нормобласт (нормоцит) поліхроматофільний – менший за розмірами від своїх попередників (в діаметрі 9–12 мкм).

Його ядро розміщене в центрі або злегка ексцентрично, щільне, з гру-

бим колесоподібним розміщенням хроматину. Ядерця не визначаються. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення становить 1:1, або зміщується в бік цитоплазми. Цитоплазма фарбується поліхроматофільно^{1*} (сприймає як кислі так і основні барвники). При фарбуванні фіксованих мазків азур-П-еозином гемоглобін в цитоплазмі зафарбовується в рожевий колір (оксифілія), а органели (РНК, рибосоми) в голубуватий (базофілія). При змішуванні цих кольорів утворюється різний відтінок цитоплазми, який залежить від вмісту і локалізації гемоглобіну. Якщо гемоглобін у цих клітинах розташовується дифузно – то вся цитоплазма фарбується у сіруватий колір, або у вигляді обідка навколо ядра. Якщо у цитоплазмі міститься велика кількість органел – цитоплазма набуватиме сіро-голубого, чи сірувато-фіолетового кольору. Кількість рибосом у цих клітинах зменшується, феритин розміщується агрегатами. Нормобласти (нормоцити) поліхроматофільні – останні клітини еритроїдного ряду (IV класу клітин гемопоєзу), що мають здатність до мітозу. Вважається, що до поділу здатні лише ранні, крупні форми цих клітин. Причиною втрати здатності до ділення є накопичення в цитоплазмі гемоглобіну до певної концентрації. Молоді нормобласти (нормоцити) поліхроматофільні діляться і диференціюються в нормобласти (нормоцити) оксифільні. У англomовних виданнях ветеринарних гематологів нормобласти (нормоцити) поліхроматофільні називають поліхроматофільними рубріцитами (polychromatophilic rubricytes) (Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Mary Anna Thrall et al., 2012).

^{1*} Поліхромазія – змішане зафарбування



Нормобласти (нормоцити) оксифільні.

Інколи в літературних джерелах їх називають ортохромними (за мідно-коричневе зафарбування цитоплазми) (Nikitin, 1956) чи ортохроматичними або ацидофільними (Khomych et al., 2019). Ці клітини втрачають здатність до поділу (V клас клітин гемопоєзу). Нормобласти оксифільні мають розмір однаковий чи трошки більший, як у зрілого еритроцита (в діаметрі близько 10 мкм). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення збільшене в бік цитоплазми. Ядро – щільне, часто пікнотичне (тобто втрачає рисунок хроматину) майже безструктурне, втрачає колесоподібне розташування хроматину (іноді не втрачає). Ядро в цій клітині розміщене ексцентрично, ніби готуючись до екструзії (виштовхування з клітини). У людей і тварин-ссавців (на відміну від птахів, риб, земноводних) це остання клітина еритроїдного ряду, яка містить ядро. Цитоплазма нормобластів (нормоцитів) оксифільних має колір як у дорослих еритроцитів у мазку – рожевий. 80% клітин на цій стадії втрачають ядро і перетворюються на кістковомозкові ретикулоцити. У англомовних виданнях ветеринарних гематологів нормобласти (нормоцити) оксифільні називають метарубріцитами (metarubricytes) (Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Mary Anna Thrall et al., 2012).

Ретикулоцит

– це наступна клітина еритроїдного ряду в кістковому мозку. Клітина не має ядра. Вона не



має здатності до мітозу (V клас клітин гемопоєзу). Дозрівання ретикулоцитів у кістковому мозку у людей відбувається протягом 36–44 год, потім вони надходять у кров у вигляді зрілих еритроцитів (VI клас клітин гемопоєзу). Вважається, що ретикулоцити не здатні до накопичення гемоглобіну (Kamyshnikov et al., 2011). Однак, є повідомлення, що у тварин на цьому етапі розвитку ретикулоцити ще повинні виробляти 20–30 % загальної кількості гемоглобіну (Weiss & Wardrop, 2010; Mary Anna Thrall et al., 2012). Такі активні виробничі процеси потребують активного синтезу разом з цитоплазматичними рибосомами, полірибосомами, рибонуклеїновими кислотами (РНК) та мітохондріями, хоча всі ці органели будуть видалені з ретикулоцитів в середньому протягом наступних 3–4 діб, а у kota – протягом 10–13 діб (рис. 1).

На відміну від зрілих еритроцитів у більшості видів тварин ретикулоцити більші, мають круглішу форму, зі значно більшою площею мембрани та меншою кількістю цитоплазми. В зафіксованому, зафарбованому класичними методами (за Романовським чи Райт-Гімзи) мазку, колір ретикулоцитів однорідний світло-синій, і такі клітини називають поліхроматофілами (табл. 1-F). В нефіксованому, зафарбованому суправітальними фарбами (новий метиленовий синій) мазку, барвники спричиняють осадження рибосомної РНК та органел у сітчастий утвір (ретикулум), який розпізнається залежно від кількості наявної РНК: якщо згруповані агрегати темно-синього матеріалу – агреговані ретикулоцити, якщо присутні дрібні пунктатні структури – пунктатні ретикулоцити (Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Mary Anna Thrall et al.,

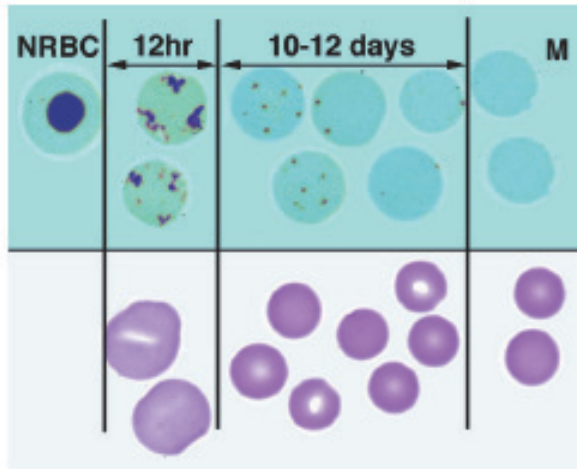


Рис. 1. Схема дозрівання ретикулоцитів у kota за фізіологічних умов за Mary Anna Thrall, 2012

2012). В англomовних виданнях ветеринарних гематологів ретикулоцити називають як і у вітчизняних виданнях – ретикулоцитами (reticulocytes) (Weiss & Wardrop, 2010; Harvey, 2012; Mary Anna Thrall et al., 2012). В медичній лабораторній практиці за ступнем зрілості ретикулоцити поділяють на п'ять груп: 1 група – ядромісні клітини нормобласти (нормоцити) (які ми відносили до нормобластів оксифільних); 2 група – без'ядерні, глибоко- чи клубкоподібні ретикулоцити. Ретикулум має вигляд грудок чи щільнозмотаного клубка, що локалізується в центрі (чи ексцентрично) клітини; 3 група – повносітчасті ретикулоцити. В них ретикулярна сітка ніби розмостується із клубка і повністю вкриває поверхню клітини; 4 група – неповносітчасті ретикулоцити. В клітині візуалізуються окремі базофільно зафарбовані нитки ретикулуму; 5 група – пілоподібні ретикулоцити. На периферії клітини (в переважній більшості) відмічаються дрібні зернисті структури (Kamyshnikov et al., 2011).

Таким чином, у процесі дозрівання еритроцитів від еритробласта до зрілої клітини проходять такі основні зміни (табл. 1):

- базофілія цитоплазми клітини (зумовлена наявністю значного вмісту РНК у рибосомах) змінюється спочатку поліхроматофілією, а потім (унаслідок збільшення кількості гемоглобіну і зменшення кількості РНК та втратою усіх органел) оксифілією;
- ядро ущільнюється, пікнотизується і виштовхується з клітини;
- розміри клітини у процесі диференціації зменшуються від 15–25 до 7–8 мкм.

За фізіологічних умов потреба в еритроцитах забезпечується за рахунок посиленого розмноження поліхроматофільних нормобластів (нормоцитів, рубріцитів). Якщо потреба організму в еритроцитах зростає (наприклад, у разі крововтрат), нормобласти (нормоцити, рубріцити) починають розвиватися із попередників, а останні – зі стовбурових кровотворних клітин.

1. Термінологія морфологічно розпізнаваних клітин постнатального еритроцитопоезу

Клітини IV класу – здатні до поділу				Клітини V класу – дозріваючі. Втратили здатність до поділу		Клітини VI класу – зрілі клітини
Еритробласт (синоніми – проеритробласт, рубрібласт)	Пронормобласт (синоніми – пронормоцит, прорубріцит)	Нормобласт базофільний (синоніми – нормоцит базофільний, рубріцит базофільний)	Нормобласт поліхроматофільний (синоніми – нормоцит поліхроматофільний, рубріцит поліхроматофільний)	Нормобласт оксифільний (отрохроматичний) (синоніми – нормоцит ацидофільний, оксифільний (отрохроматичний), метарубріцит)	Ретикулоцит	Зрілий еритроцит.
						

До поділу здатні клітини IV класу (еритробласт, пронормоцит, нормоцит базофільний і крупні молоді клітини нормоцита поліхроматофільного).

Клітини V класу (нормоцит оксифільний і ретикулоцити кісткового мозку та крові) не мають здатності ділитися, вони лише дозрівають.

Процес гемоглобінізації в клітинах еритроїдного ряду розпочинається в базофільних нормобластах (синоніми нормоцити, рубріцити) і завершується в ретикулоцитах. В зрілих еритроцитах (VI клас клітин) процес утворення гемоглобіну також відсутній.

Висновки і перспективи

При аналізі постнатального еритроцитопоезу в нормі та за патології, з метою отримання достовірної інформації, необхідно до офіційних

назв клітин цього процесу додавати назви їх синонімів, які використовують вітчизняні та зарубіжні гематологи.

Узагальнена термінологія клітин постнатального еритроцитопоезу тварин на основі їх морфологічної специфіки може бути представлена наступним чином: 1. Еритробласт (синоніми – проеритробласт, рубрібласт) → 2. Пронормобласт (синоніми – пронормоцит, прорубріцит) → 3. Нормобласт базофільний (синоніми – нормоцит базофільний, рубріцит базофільний) → 4. Нормобласт поліхроматофільний (синоніми – нормоцит поліхроматофільний, рубріцит поліхроматофільний) → 5. Нормобласт оксифільний (отрохроматичний) (синоніми – нормоцит оксифільний (отрохроматичний), метарубріцит) → 6. Ретикулоцит → 7. Зрілий еритроцит.

References:

- Abramov, M. G. (1985). *Gematologicheskii atlas* [Hematological atlas]. Moscow: Meditsina, 344. (in Russian)
- Anderson, S. H., (2007). *Atlas gematologicheskii* [Hematological atlas]. Moscow: Logosfera, 608. (in Russian)
- Bazarnova, M. A. (1982). *Rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike* [Clinical Laboratory Diagnostics Guide]. Kiev: Vischa shkola, 2:175. (in Ukrainian)
- Dudok, V. V., Ivanova-Sohomonian, A. Y., Lutsyk, O. D. & Chaikovskiy, Yu. B. (2001). *Mizhnarodna histologichna nomenklatura (ukrainsko-anhliiskiy-latynskiy slovnyk terminiv z tsytologii, histologii ta mikroanatomii)* [International histological nomenclature]. Lviv: Nautilus, 284. (in Ukrainian)
- Harvey, J. W. (2012). *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*, <https://www.elsevier.ca/ca/product.jsp?isbn=9781437701739>
- Heilmeger, L., Begemann, H., Löffler, H., Rastetter, J. & Haferlach, T. (2005). *Atlas of clinical Hematology*. 6th Edition, <http://site.iugaza.edu.ps/akhudair/files/Atlas-of-Clinical-Hematology-6th-Edition.pdf>
- Kamyshnikov, V. S., Volotovskaya, O. A., Hodyukova, A. B., Dal'nova, T. S., Vasiliu-Svetlickaya, S. G., Zubovskaya, E. T. & Alekhovich L. I. (2011). *Metody klinicheskikh laboratornykh issledovaniy* [Clinical Laboratory Research Methods]. Minsk: MEDpress-inform, 745. (in Russian)
- Kaushansky, K., Lichtman, M. A., Prchal, J. T., Levi, M. M., Press, O. W. & Burns, L. J. (2010). *Williams Hematology*, Eighth Edition, <https://www.amazon.com/Williams-Hematology-Eighth-Kenneth-Kaushansky/dp/0071621512>
- Khomych, V. T., Mazurkevych, T. A., Dyshliuk, N. V., Stehnei, Zh. H. & Usenko, S. I. (2019). *Nomina embrilogica veterinaria/ Mizhnarodna veterynarna histologichna nomenklatura (Terminologichnyi slovnyk)* [International Veterinary Histological Nomenclature]. FOP Yamchynskiy O.V., 276. (in Ukrainian)
- Kudryavtsev, A. A. & Kudryavtseva, L. A. (1974). *Klinicheskaya gematologiya zhivotnykh* [Clinical hematology of animals]. Moscow: Kolos, 399. (in Russian)
- Levchenko, V. I., Vlizlo, V. V., Kondrakhin, I. P., Melnyk, Y. L., Sudakov, M. O., Chumachenko, V. Yu., Bezukh, V. M., Bohatko, L. M., Holovakha, V. I., Lysenko, V. V. & Sakhniuk, V. V. (2004). *Klinichna diahnozyka vnutrishnikh khvorob tvaryn* [Clinical diagnosis of internal animal diseases]. Bila Tserkva: VAT «Bilotserkivska knyzhkova fabryka», 608. (in Ukrainian)
- Lutsyk, O. D., Ivanova, A. Y., Kabak, K. S. & Chaikov, Yu. B. (2003). *Histologhiia liudyny* [Human histology], <https://www.slideshare.net/guculiak/2003-43321493>
- Mary Anna Thrall, Glade Weiser, Robin Allison & Terry Campbell (2012). *Veterinary hematology and clinical, chemistry*/edited by 2nded. <https://books.google.com.ua/books?id=PjCanfyADvIC&pg=PT22&lp-g=PT22&dq=Veterinary+hematology+and+clinical+chemistry>
- Mazurkevych, A. Y., Kovpak, V. V., Danilov, V. B., Maliuk, M. O. & Kharkevych, Yu. O. (2014). *Klitynni tekhnologii u veterynarnii medytsyni* [Cellular technologies in veterinary medicine]. Kyiv: Komprynt, 132. (in Ukrainian)
- Nikitin, V. N. (1956). *Gematologicheskii atlas* [Hematological atlas]. Moscow: Gosudarstvennoe izdatelstvo sel'skohozyaystvennoy literatury, 259. (in Russian)
- Rigan, V. Dzh., Sanders, T. G. & Denikola, D. B. (2000). *Atlas veterinarney gematologii* [Atlas of Veterinary Hematology]. Moscow: OOO «AKVARIUM LTD», 136. (in Russian)
- Tretiak, N. M. (2005). *Hematologhiia Navch. posibnyk* [Hematology: A textbook]. Kyiv: Zovnishnia torhivlia, 240. (in Ukrainian)
- Weiss, D. J. & Wardrop, K. J. (2010). *Schalm's veterinary hematology*. – 6th ed. <http://vetbooks.ir/schalms-veterinary-hematology-6th-edition/>

Boiko N. I., Boiko G. V. (2020). CHARACTERISTICS AND TERMINOLOGY OF EERTHROID CELLS. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 11(2): 72–81, <https://doi.org/10.31548/ujvs2020.02.007>

Abstract. *The first morphologically recognized cell of erythrocytopoiesis is erythroblast. During the maturation of erythrocytes from the erythroblast to the mature cell undergo the following major changes: the basophilia of the cytoplasm of the cell (due to the presence of significant RNA content in the ribosomes) is changed first by polychromatophilia, and then (due to the increased hemoglobin and decreased RNA content and loss of all the organelles; oxyphilia; the nucleus is compacted, pyknotized and pushed out of the cell; cell sizes in the process of differentiation decrease from 15–25 to 7–8 microns.*

In the analysis of postnatal erythrocytopoiesis in the normal and pathology, in order to obtain reliable information, it is necessary adding to the official names there synonyms which are used by our and foreign hematologists. Summarizing the terminology of the cellular elements of postnatal erythrocytopoiesis of animals on the basis of their morphological specificity can be represented as follows: 1. Erythroblast (synonyms – proerythroblast, rubriblast) → 2. Pronormoblast (synonyms – pronormocyte, prorubricytis) → 3. Normoblast basophilic (synonyms – normocyte basophilic, rubricyte basophilic) → 4. Normoblast polychromatophilophil. Normoblast oxyphilic (otrochromatic) (synonyms – normocyte oxyphilic (orthochromatic), metarubricyte) → 6. Reticulocyte → 7. Mature erythrocyte.

Under physiological conditions, the need in the red blood cells is ensured by enhanced reproduction of polychromatophilic normoblasts. If the body's need for red blood cells increases (for example, in the case of blood loss), normoblasts begin to develop from precursors, and the latter – from stem hematopoietic cells.

Class IV cells (erythroblast, pronormoblast, basophilic normoblast and large young normoblast polychromatophilic cells) are capable of division. Class V cells (normocyte oxyphilic and bone marrow and blood reticulocytes) are not capable of division, they only mature. The process of hemoglobinization in cells of the erythroid row begins in the basophilic normoblasts and ends in the reticulocytes. In mature red blood cells (class VI cells) the formation of hemoglobin does not occur.

Keywords: *Erythrocytopoiesis, erythroblast, proerythroblast, pronormoblast, prorubricyte, normoblast, normocyte, rubricyte, metarubricyte, reticulocyte, erythrocyte, hemoglobinization in the cell*

Подано до друку 30 січня 2020 року