

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»

Кваліфікаційна освітньо-наукова праця
на правах рукопису

СТРОЯНОВСЬКА ЛІЛІЯ ВАСИЛІВНА

УДК 636.2:618.19:615.038:57.089(043)

ДИСЕРТАЦІЯ
ІМУНОБІОЛОГІЧНА РЕАКТИВНІСТЬ ОРГАНІЗМУ КОРІВ ІЗ
ЗАПАЛЬНИМ ПРОЦЕСОМ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА ДІЇ
ЛІПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ
ЕТИЛТІОСУЛЬФАНИЛАТУ

211 – ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання
на відповідне джерело



Л.В. Строяновська

Науковий керівник – **Супрович Тетяна Михайлівна**,
доктор сільськогосподарських наук, професор

Кам'янець-Подільський – 2025

АНОТАЦІЯ

Строяновська Л.В. Імунобіологічна реактивність організму корів із запальним процесом молочної залози за дії ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату.

Кваліфікаційна освітньо-наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина (21 Ветеринарія). Заклад вищої освіти «Подільський державний університет», Кам'янець-Подільський, 2025.

Мастит корів є однією з найбільш поширених і дорогих хвороб молочної худоби у всьому світі. Запалення молочної залози значною мірою впливає на виробництво молока та якість продукції, здоров'я та добробут тварин, економічний прибуток молочної промисловості та здоров'я населення. Найпоширенішими ізолятами, які виділяються при клінічній та прихованій формами маститу є *Staphylococcus aureus* та коагулазонегативні стафілококи, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma bovis*. При запаленні молочної залози в крові відбуваються певні зміни метаболічного гомеостазу та імунної реактивності організму тварин. З'являється дисфункція пероксидного окиснення ліпідів та зниження антиоксидантного захисту. Заборона на використання антибактеріальних препаратів для дійних корів примушує до пошуку нових ефективних та безпечних засобів. До альтернативних методів лікування запальних процесів молочної залози належать використання пробіотиків, фітопрепаратів, препаратів на основі йоду, бактеріофагів. Тому проведення вичерпних досліджень в даному напрямку – це важливий етап, який дасть можливість використовувати альтернативне лікування корів за маститів при допомозі ліпосомальних препаратів.

Дисертаційне дослідження спрямоване на аналіз поширення захворювань молочної залози корів у господарствах Хмельницької області, ідентифікацію мікробіоти за катарального і субклінічного маститу корів, виявлення чутливості основних збудників до антибактеріальних препаратів, визначення впливу нового комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на активність антиоксидантного захисту та фізіологічну активність клітинної і

гуморальної ланки природного і адаптивного імунітету корів з клінічним і субклінічним перебігом маститу; встановлення можливості використання ДНК-маркерів асоційованих з КСК молока з метою профілактики захворювань вим'я корів української чорно-рябої молочної породи.

Встановлено, що в господарствах Хмельницької області на субклінічний мастит корів в середньому хворіє 28,9% від усього поголів'я тварин, в приватному секторі цей показник дорівнює 9,7%. В господарствах ТОВ НВА «Перлина Поділля» та ФГ «Подільська марка» на субклінічний мастит хворіє 14 та 12,9%, на клінічний – 2,8% та 2,5% відповідно.

У ході бактеріологічних досліджень 40 проб секрету вим'я від корів з клінічним і субклінічним перебігом маститу було виділено 85 ізолятів мікроорганізмів. Із числа виділених культур 57,6% були представлені грампозитивними коками, 20% – родиною *Enterobacteriaceae*, серед яких *Escherichia coli* становило 12,9%. Домінуючими були стафілококи – 34,1%, стрептококи – 23,6%. Бактеріальна етіологія за клінічного і субклінічного перебігу маститу корів має свої особливості. При клінічному перебігу в асоціаціях патогенних мікроорганізмів питома вага належить стафілококам (41,2%). За прихованого перебігу захворювання переважають представники роду *Streptococcus* (26,5%) та *Staphylococcus* (23,5%). Епізоотичні штами *Staphylococcus aureus* в проявили помірну резистентність до 43,7% антибактеріальних препаратів, *Streptococcus agalactiae* – до 56,5%.

Дослідження морфологічного профілю крові хворих на мастит корів виявило певні коливання як при клінічній так і субклінічній формах захворювання. По відношенню до групи здорових тварин на початковому етапі гемоглобін у хворих корів був нижче ніж у здорових за катарального маститу на 8,96% ($P < 0,05$), за субклінічного на 4,37% ($P < 0,05$); кількість еритроцитів у хворих корів була нижче на 7,78% ($P < 0,05$) і на 6,11%; збільшення лейкоцитів на 52,9% ($P < 0,001$) і на 37,8% відповідно.

Лікування хворих корів ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату супроводжується позитивними змінами морфології крові. Найбільше відхилення виявлено для вмісту лейкоцитів, кількість яких зросла на $1,94 \times 10^9/\text{л}$ або 20,3% ($P < 0,05$) відносно початку дослідження за катарального

мастити та на $1,88 \times 10^9/\text{л}$ або 35,9% ($P < 0,01$) за субклінічного маститу. Для гемоглобіну і еритроцитів динаміка не перевищувала 6–11%, із вірогідністю прояву лише на сьому добу дослідження.

Вміст загального білка у сироватці крові корів з катаральним маститом був меншим на 4,86% порівняно з контролем, з субклінічним – на 5,5% відповідно. Після застосування ліпосомального препарату на основі ЕТС спостерігається стабільний приріст протеїнової фракції. На сьому добу рівень протеїнів збільшився відносно першої доби на 12,1% ($P < 0,05$) у тварин за катарального і 8,52% ($P < 0,05$) за субклінічного маститу.

В лейкоцитарній формулі у хворих корів на початку дослідження спостерігалася суттєве відхилення від норми в сторону зменшення частки лімфоцитів на 10,1% ($P < 0,05$) за катарального маститу та на 6,3% за субклінічного. За клінічною формою вірогідне збільшення відносно контрольної групи виявлено для еозинофілів (1,46%; $P < 0,05$), моноцитів (0,78%; $P < 0,05$) і паличкоядерних нейтрофілів, рівень яких був у 2,65 ($P < 0,001$) разів вищим у хворих корів. За субклінічною формою виявлено аналогічні, але статистично не значимі відхилення, за виключенням моноцитів (1,97%; $P < 0,01$). Після введення препарату на основі ЕТС для більшості її складових спостерігається позитивна динаміка щодо нормалізації лейкограми до стандартних показників лейкоцитів за обох форм перебігу захворювання. Необхідно відмітити відновлення лімфоцитів до рівня контрольної групи.

Виявлено збільшення кількості проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ в крові у корів як з катаральним так і з субклінічним маститом. За клінічного маститу кількість ГПЛ була більше на 16,4%; ТБК-активних продуктів на 3,5%, за субклінічного на 38,5% ($P < 0,01$) і 27,1% ($P < 0,01$), відповідно. Після ін'єкцій лікувальної форми наступала стійка динаміка зменшення кількості обох компонентів. Так, за клінічного маститу кількість ГПЛ на сьому добу скоротилася на 38,2% ($P < 0,001$), ТБК-активних продуктів на –7,42% ($P < 0,05$), за субклінічного – на 53,5% ($P < 0,001$) і 21,2% ($P < 0,05$) відповідно.

Встановлено, що корови з клінічним маститом мали вміст альдегідних (ОМП₃₇₀) та кетонових похідних (ОМП₄₃₀) до початку лікування вищий ($P < 0,05$ – $0,01$) у порівнянні з даними отриманими для контрольної групи. Відхилення для альдегідних похідних складало 30,9%, а для кетонових – 14,2%. Застосування

експериментального препарату супроводжувалося пригніченням інтенсивності окисних процесів і зменшенням у крові хворих тварин альдегідних похідних ОМП₃₇₀ на 16,3% ($P < 0,05$) на сьому добу лікування. Аналогічні зміни виявлено для кетонових похідних з показником 27,8% ($P < 0,01$). За субклінічного маститу вміст похідних ОМП₃₇₀ та ОМП₄₃₀ до початку лікування також був вірогідно вищим ($P < 0,05$) порівняно з показниками у корів контрольної групи. Відхилення альдегідних похідних склало 12,3%, а для кетонових – 19,4%. Після лікування відбулося пригнічення інтенсивності окисних процесів, на що вказує більш низький вміст на 25% ($P < 0,05$) у крові корів дослідної групи альдегідних похідних ОМП₃₇₀ на сьому добу лікування. Аналогічні зміни зафіксовано у вмісті кетонових похідних. Однак виявлене відхилення не було статистично значимим.

Лікування ЕТС препаратом сприяло зниженню інтенсивності процесів окиснення і зростанню активації захисних механізмів антиоксидантної системи. Встановлені нами показники для ензимів антиоксидантного захисту, каталази, супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази, продемонстрували стабільну односторонню динаміку з високою достовірністю на 7 добу експерименту ($P < 0,01$) для корів обох форм маститу. Така ж динаміка в обох дослідках виявлена для метаболіту ВГ в еритроцитах ($P < 0,05$).

Результати досліджень популяційного та субпопуляційного складу Т- і В-лімфоцитів у крові корів показали, що імунна система корів, хворих на катаральний і субклінічний мастит реагує зниженням популяції імунокомпетентних клітин. Після внутрішньом'язевого введення ліпосомального препарату з ЕТС спостерігалось зменшення «нульових» в загальній кількості розеткоутворюючих Т-лімфоцитів (ТЕ-РУЛ), в активних розеткоутворюючих Т-лімфоцитів (ТА-РУЛ) і в теофілінрезистентних лімфоцитів (Th-РУЛ) за обох форм захворювання. За катарального маститу виявлено скорочення від 1,7% (ТА-РУЛ) до 3,9% (ТЕ-РУЛ) ($P < 0,05$), за субклінічного спостерігався більш інтенсивний процес впливу препарату на зменшення лімфоцитів від 2,3% (ТЕ-РУЛ) до 9,5% (Th-РУЛ) ($P < 0,01$). Одночасно відбувалося незначне збільшення частки Т-супресорів у крові корів: за катаральній формі маститу на 2,2%, за субклінічній – на 2%.

Серед В-лімфоцитів явне переважання належить недиференційованим В-

лімфоцитам: для корів з катаральною формою маститу їх частка становила 60% до застосування ліпосомального препарату, за субклінічного маститу – 62,6%.

Після застосування лікувальної субстанції частка активних В-лімфоцитів (з низькою і середньою авідністю) у першому досліді мала зростання на 2,7% ($P < 0,05$) на сьому добу експерименту. За субклінічній формі у другому і третьому зразках крові виявлено мінімальне зменшення розеткоутворюючих ЕАС-РУЛ лише на 0,7%.

За результатами дослідження встановлено, що бактерицидна та лізоцимна активність сироватки крові у хворих корів була значно меншою, ніж у здорових тварин. Виявлені відхилення були статистично значимими ($P < 0,01$) для обох форм маститу. Після лікування ліпосомальною субстанцією на основі ЕТС встановлено інтенсивне зростання бактерицидної на 9% ($P < 0,01$) та лізоцимної активності на 6,2% ($P < 0,01$) на 7 добу для зразків крові взятих у корів з катаральним маститом. У другому досліді ріст показників був більш вагомим і становив 11,4% ($P < 0,01$) та 11% ($P < 0,001$).

Встановлено, що кількість ЦІК у сироватці крові хворих корів під дією ліпосомального препарату зменшилася. Показники у корів дослідної групи з клінічним маститом зменшилися на третю добу на 17% ($P < 0,01$) і сьому добу експерименту додатково ще на 5% ($P < 0,001$). Висока ефективність ліпосомального препарату вже на третю добу дозволила знизити показник ЦІК до рівня, який перевершив дані контрольної вибірки. У корів з субклінічним маститом на сьому добу зменшення вмісту ЦІК склало 19,5% ($P < 0,001$) і було меншим від показника контрольної групи на 5,3%.

Терапевтичний ефект лікування катарального маститу корів комплексним ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату проявлявся в середньому на 3 – 5 добу і становив 90%. За субклінічного маститу – через 24-48 годин і становив 100%.

Встановлено статистично значимі асоціації між двома алелями гена BoLA-DRB3 та низьким і високим рівнем КСК. Алель BoLA-DRB3.2*24 має асоціативний зв'язок з низьким вмістом соматичних клітин у молоці, алель BoLA-DRB3.2*22 – з високим рівнем КСК.

Виконаний в роботі аналіз та аналіз виявлених результатів вказує на

позитивний вплив ліпосомальної субстанції на основі етилтіосульфанілату на перебіг захворювання, що зумовлює можливість його застосування при лікуванні корів з катаральною та субклінічною формами маститу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексні дослідження, що характеризують мікробіологічні, біохімічні та імунологічні особливості гомеостазу організму корів за клінічного і субклінічного перебігу запальних процесів молочної залози у корів і показано ефективність нового ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату за внутрішньом'язового його введення. Доповнено дані щодо характеристики мікробіоти секрету молочної залози у корів за клінічного і субклінічного перебігу маститу та чутливості основних збудників захворювання до сучасних антибактеріальних препаратів.

Доведено нормалізуючий вплив компонентів нового комплексного ліпосомального препарату (з концентрацією ЕТС 1,25%) на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів і окисної модифікації протеїнів, активність ензимів антиоксидантного захисту, активність клітинної і гуморальної ланок природного і адаптивного імунітету в крові хворих на катаральний і субклінічний мастит корів.

Вперше для популяції корів української чорно-рябої молочної породи виявлено вірогідний зв'язок алелів гена BoLA-DRB3 з соматичними клітинами молока. Встановлено асоціацію алеля BoLA-DRB3.2*22 з високою та алеля BoLA-DRB3.2*24 – низькою КСК у молоці корів.

Практичне значення отриманих результатів. Використання нового комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату активно впливає на приведення до фізіологічної норми гематологічного, біохімічного та імунологічного профілю крові хворих на клінічний і субклінічний мастит корів, що має практичне значення і може використовуватися як альтернативний метод його лікування у корів.

Практичне значення отриманих результатів підтверджено актами впровадження у виробництво. Результати роботи використовуються в навчальному процесі при підготовці фахівців ОР «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України,

Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького та Одеському державному аграрному університеті.

Ключові слова: корови, збудники маститу, катаральний і субклінічний мастит, природний і адаптивний імунітет, антиоксидантний захист, соматичні клітини, ліпосомальний препарат, етилтіосульфанілат, алелі гена BoLA-DRB3.

ANNOTATION

Stroianovska L.V. Immunobiological reactivity of cows with inflammatory process of the mammary gland under the influence of liposomal preparation based on ethylthiosulfanylate.

Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 211 – Veterinary medicine (21 Veterinary). Higher educational institution «Podillia State University», Kamianets-Podilskyi, 2025.

Mastitis is one of the most common and financially costly diseases affecting dairy cows worldwide. It is widely acknowledged that mammary inflammation exerts a substantial influence on various aspects of dairy production and quality, including milk yield, product quality, animal health and welfare, the dairy industry, and community health. The most common isolates that are isolated in clinical and latent forms of mastitis are *Staphylococcus aureus* and *coagulase-negative Staphylococci*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma bovis*. When the mammary glands are inflamed, there are some changes in how the animal's metabolism and immune system work, and these changes can be seen in the blood. There is a dysfunction of lipid peroxidation and a decrease in antioxidant protection. The prohibition on the utilization of antibacterial pharmaceuticals for dairy cows is compelling the exploration of novel, effective, and safe products. Alternative methods of treating inflammatory processes of the mammary gland include the use of probiotics, herbal remedies, iodine-based drugs, and bacteriophages. In this regard, it is imperative to Conducting thorough research will facilitate the utilization of alternative methods of treating udder pathology in cows with liposomal preparations.

The objective of the present dissertation research is to ascertain the effect of a newly formulated complex liposomal preparation, comprising ethylthiosulfanylate, on the activity of antioxidant defense, nonspecific resistance, cellular and humoral immunity of bovines afflicted with clinical and subclinical mastitis.

The dissertation research is aimed at analyzing the spread of mammary gland diseases in cows in the farms of Khmelnytsky region, identifying the microbiota in catarrhal and subclinical mastitis of cows, identifying the sensitivity of the main pathogens to antibacterial drugs, determining the effect of a new complex liposomal preparation based on ethylthiosulfanylate on the activity of antioxidant defense and physiological activity of the cellular and humoral links of natural and adaptive immunity of cows in the clinical and subclinical course of mastitis; the ascertain of employing DNA markers associated with milk SCC as a preventative measure against udder diseases in Ukrainian Black-and-White dairy cows.

It was found that on average 28,9% of the total number of animals in Khmelnytskyi region farms suffer from subclinical mastitis, while in the private sector this figure is 9,7%. On the farms of «Perlyna Podillia» LLC and «Podilska Marka» Farm, 14% and 12,9% of cows suffer from subclinical mastitis, and 2,8% and 2,5% from clinical mastitis, respectively.

A total of 85 microorganisms were isolated through bacterial studies on 40 samples of udder secretions from cows with clinical and subclinical mastitis. Of the isolated cultures, 57,6% were represented by gram-positive cocci, 20% by the family *Enterobacteriaceae*, among which *Escherichia coli* accounted for 12,9%. Staphylococci were dominant – 34,1% and streptococci – 23,6%. Bacterial etiology in the clinical and subclinical course of cow mastitis has its own characteristics. In the clinical course, staphylococci (41,2%) account for the majority of pathogenic microorganisms in associations. In the latent course of the disease, representatives of the genus *Streptococcus* (26,5%) and *Staphylococcus* (23,5%) prevail. Epizootic strains of *Staphylococcus aureus* showed moderate resistance to 43,7% of antibacterial drugs, *Streptococcus agalactiae* - to 56,5%.

In both clinical and subclinical forms of mastitis, the indicators fluctuation was found in both clinical and subclinical forms of the disease in the peripheral blood of cows. In relation to the group of healthy animals at the initial stage, hemoglobin in sick animals

was lower than in healthy animals with catarrhal mastitis by 8,96% ($P < 0,05$), with subclinical mastitis by 4,37% ($P < 0,05$); the number of red blood cells in diseased cows was lower in catarrhal mastitis by 7,78% ($P < 0,05$), in subclinical mastitis by 6,11%; leukocyte count increased by 52,9% ($P < 0,001$) and 37,8%, respectively.

Treatment with a liposomal preparation based on ethylthiosulfanylate in sick cows is accompanied by changes in the components of the hematological blood profile. The greatest deviation was found for the leukocyte content, the number of which increased by $1,94 \times 10^9/l$ or 20,3% ($P < 0,05$) relative to the beginning of the experiment in the clinical form and $1,88 \times 10^9/l$ or 35,9% ($P < 0,01$) in the subclinical form of mastitis. For hemoglobin and erythrocytes, the dynamics did not exceed 6 – 11%, with the probability of manifestation only on the seventh day of the study.

Cows with catarrhal mastitis had a total protein content in the blood serum that was 4,86% less than in the control and 5,5% less than in the subclinical case. After administration of the liposomal preparation based on ETS, a stable increase in the protein fraction was observed. On the seventh day, the level of proteins increased relative to the first day by 12,1% ($P < 0,05$) in animals with catarrhal mastitis and 8,52% ($P < 0,05$) in subclinical mastitis.

At the start of the experiment, the leukocyte formula in diseased cows showed a substantial deviation from the normal, with an increase in lymphocytes proportion by 10,1% ($P < 0,05$) for catarrhal mastitis and 6,3% for subclinical mastitis. In the clinical form, a significant increase relative to the control group was found for eosinophils (1,46%; $P < 0,05$), monocytes (0,78%; $P < 0,05$) and neutrophils, the level of which was 2,65 ($P < 0,001$) times higher in diseased cows. In the subclinical form, similar, but statistically insignificant deviations were found, with the exception of monocytes (1,97%; $P < 0,01$). After the direction of the ETS based drug, most of its components showed positive dynamics in the normalization of the leukogram to standard leukocyte counts in both forms of the disease. It is important to note that the lymphocytes have returned to the level of the control group.

The blood of cows with catarrhal and subclinical mastitis had more intermediate and final products of lipid peroxidation observed. In clinical mastitis, the amount of lipid hydroperoxides was 16,4% higher; TBA-active products by 3,5%, in subclinical mastitis by 38,5% ($P < 0,01$) and 27,1% ($P < 0,01$), respectively. After injections of

the therapeutic formulation, there was a steady decrease in the amount of both components. Thus, in clinical mastitis, the amount of LOOHs on the seventh day decreased by 38,2% ($P < 0,001$), TBA-active products by – 7,42% ($P < 0,05$), in subclinical mastitis – by 53,5% ($P < 0,001$) and 21,2% ($P < 0,05$), respectively.

It was found that in cows with clinical mastitis, the content of aldehydes (OMP₃₇₀) and ketone derivatives (OMP₄₃₀) before treatment was significantly higher ($P < 0.05$ – 0.01) compared to the group of healthy cows. The deviation for aldehyde derivatives was 30.9%, and for ketone derivatives – 14,2%. The introduction of the experimental drug was accompanied by an inhibition of the intensity of oxidative processes and a decrease in the content of aldehyde derivatives of OMP₃₇₀ in the blood of the treated animals on the seventh day of treatment by 16.3% ($P < 0.05$). A similar transformation was found for ketone derivatives with an index of 27,8% ($P < 0,01$). In subclinical mastitis, the content of OMP₃₇₀ and OMP₄₃₀ derivatives before treatment was also significantly higher ($P < 0,05$) compared to the indicators in the control group. The deviation of aldehyde derivatives was 12,3%, and for ketone derivatives – 19,4%. After treatment, there was an inhibition of the intensity of oxidative processes with a 25% ($P < 0,05$) decrease in the content of aldehyde derivatives of OMP₃₇₀ in the blood of cows of the experimental group on the seventh day of treatment. The content of ketone derivatives showed similar changes, but the deviation detected was not statistically significant.

The administration of the pharmaceutical agent ETS to treat resulted in a decline in the intensity of oxidative processes and an augmentation in the activation of the protective mechanisms of the antioxidant system. The parameters established by us for enzymes of antioxidant protection of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase demonstrated stable one-sided dynamics with high reliability on day 7 of the experiment ($P < 0,01$) for cows of both forms of mastitis. The same dynamics in both experiments were found for the metabolite reduced glutathione in red blood cells ($P < 0,05$).

Research into the make-up of T- and B-lymphocytes in the blood of cows with catarrhal and subclinical mastitis shows that their immune systems react by lowering the number of these important cells. After intramuscular inoculation of a liposomal preparation with ETS, a decrease in "zero" TE-RFC (total lymphocytes), TA-RFC (active lymphocytes) and Th-RFC (helper lymphocytes) was observed in both forms

of the disease. In catarrhal mastitis, a decrease from 1,7% (TA-RFC) to 3,9% (TE-RFC) was detected ($P < 0,05$), in subclinical mastitis, a more intense process of the drug's effect on the reduction of lymphocytes from 2,3% (TE-RFC) to 9,5% (Th-RFC) was observed ($P < 0,001$). At the same time, there was a slight increase in the proportion of T-suppressors by 2,2% in the blood of cows with catarrhal mastitis and by 2% – subclinical mastitis.

Within the B-lymphocyte population, a pronounced predominance was observed for the "zero" variant. In the case of cows exhibiting clinical symptoms, this variant constituted 57,8% of the total, while in the control and experimental (prior to the administration of liposomal preparation) groups, the figure was 60%. In the blood of animals with subclinical mastitis, there was a much more significant difference: 50% and 62,6%, respectively. After the use of the therapeutic substance, the proportion of active B-lymphocytes in catarrhal mastitis increased by 2,7% ($P < 0,05$) on the seventh day of the study. In the subclinical form, a minimal decrease in rosette-forming B-lymphocyte (EAC- RFC) was found in the second and third blood samples by only 0,7%.

The study's findings indicated that the bactericidal and lysozyme activity of blood serum in sick cows was significantly lower than in healthy animals. The detected deviations were statistically significant ($P < 0,01$) for both forms of mastitis. After treatment with liposomal ETS substance, an intensive increase in bactericidal activity by 9% ($P < 0,01$) and lysozyme activity by 6,2% ($P < 0,01$) on day 7 was found for blood samples taken from cows with catarrhal mastitis. In the second experiment, the growth of indicators was more significant and amounted to 11,4% ($P < 0,01$) and 11% ($P < 0,001$).

The investigation revealed that the quantity of circulating immune complexes (CICs) in the blood serum of diseased cows diminished under the influence of liposomal preparation. In the cows of the experimental group with clinical mastitis, the indicators went down by 17% ($P < 0,01$) on the third day and on the seventh day of the experiment by an additional 5% ($P < 0,001$). The high efficacy of the liposomal drug on the third day allowed it to reduce the CICs to a level that exceeded the data of the control sample. In cows with subclinical mastitis on the seventh day, the decrease in CICs content was 19,5% ($P < 0,001$) and was 5,3% less than in the control group.

The therapeutic efficacy of a complex liposomal preparation based on ethyl thiosulfanylate in treating bovine catarrhal mastitis was observed to manifest on

average between days 3 and 5, with an average success rate of 90%. In the case of subclinical mastitis, the therapeutic effect was observed to occur within 24 to 48 hours, achieving a 100% success rate.

A significant relationship has been established between two alleles of the BoLA-DRB3 gene and low and high levels of somatic cells. The BoLA-DRB3.2*24 allele has been shown to be associated with low somatic cell content in milk, and the BoLA-DRB3.2*22 allele with high SCC levels.

The analysis of results obtained indicates a positive effect of the liposomal substance based on ethylthiosulfanylate on course of the disease, that determines the possibility of its use in treatment of cows with catarrhal and subclinical forms of mastitis.

The practical significance of the results is as follows: the use of a new complex liposomal preparation based on ethylthiosulfanylate has been shown to have a significant impact on the restoration of the physiological, biochemical, and immunological blood profile of patients with clinical and subclinical mastitis in cows. This finding is of practical importance and can be used as an alternative method of treatment in cows.

The practical significance of the results obtained is confirmed by the acts of implementation in production. The results of the work are used in the educational process in the training of specialists of the Master's degree program in Veterinary Medicine, specialty 211 «Veterinary Medicine» at the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after Hzhyskyi and Odesa State Agrarian University.

Key words: cows, mastitis pathogens, catarrhal and subclinical mastitis, immune status, liposomal preparation ethylthiosulfanylate, antioxidant protection, somatic cells, BoLA-DRB3 gene alleles.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Колективна монографія

1. Супрович, Т., Супрович, М., Строяновська, Л., & Чорний, І. (2021). Поліморфізм гена BOLA-DRB3 при маститах у корів. *Наука XXI ст.: виклики та*

перспективи: колективна монографія в 2-х томах, 2, 163–178. <http://188.190.33.55:7980/jspui/handle/123456789/9027> (Здобувачка дослідила інформацію в інтернеті та літературні джерела стосовно поліморфізму гена *BoLA-DRB3* та підготувала монографію до друку).

Статті у виданнях, які проіндексовані у базі даних Scopus/WoS:

2. Suprovych, T.M., Suprovych, M.P., Mokhnachova, N.B., Biriukova, O.D., **Strojanovska, L.V.**, & Chepurna, V.A. (2021). Genetic variability and biodiversity of Gray Ukrainian cattle by *BoLA-DRB3* gene. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 12(1), 33–41. <https://doi.org/10.15421/022106> (Здобувачка проводила аналіз фореграм та оформляла матеріали статті до друку).

3. Suprovych, T., **Stroianovska, L.**, Vishchur, O., Havryliak, V., Vasylyuk, S., Masyuk, M., Solovodzinska, I., & Lubenets. (2023). Influence of liposomal thiosulfonate drug on the blood parameters of cows suffering catarrhal mastitis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(2), 195–202. <https://doi.org/10.15421/022329> (Здобувачка виконала дослідження впливу ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на гематологічні та біохімічні показники крові корів, хворих на катаральний мастит та підготувала матеріали до друку).

Статті у фахових наукових виданнях України, включених до категорії Б:

4. **Строяновська, Л.**, & Супрович, Т. (2021). Поширення та етіологія маститів у фермерському господарстві. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 100, 16–21. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.04> (Здобувачка брала участь у відборі біологічного матеріалу, провела дослідження по виявленню збудників і частоти ураження при маститах корів у фермерському господарстві та підготувала матеріали до друку).

5. **Строяновська, Л.**, & Супрович, Т. (2022). Встановлення зв'язку між соматичними клітинами молока і ДНК-маркерами у корів. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 102-103, 111–117. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.102.19> (Здобувачка провела дослідження поліморфізму гена *BoLA-DRB3* і пошук його алелів системі «алель–КСК» асоційованих з високим і низьким рівнем соматичних клітин в молоці корів та підготувала матеріали до друку).

6. Suprovych, T., Suprovych, M., **Strojanovska, L.**, & Chorny, I. (2023). Model of sensitivity cattle to mastitis on the basis of lymphocytic and molecular genetic markers. *Podilian Bulletin: Agriculture, Engineering, Economics*, (36), 73–78. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2022-1> (Здобувачка здійснила пошук в інтернеті та проаналізувала інформацію з наукових джерел по молекулярним маркерам та підготувала статтю до друку).

7. **Строяновська, Л.** (2024). Біохімічний профіль крові у хворих на мастит корів за дії ліпосомального препарату. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка, Ветеринарні науки*. 1(42), 160–165. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2024-1.25>.

Патент України на корисну модель

8. Супрович Т.М., Супрович М.П., Данчук О.В., Строяновська Л.В. Спосіб виявлення стійкості/схильності до маститу великої рогатої худоби у ранньому постнатальному онтогенезі : пат. на корисну модель 151429, Україна: заявл. 31.01.2022; опубл. 20.07.2022. Бюл. №29. (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів та оформленні патенту).

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

9. **Строяновська, Л.**, & Супрович, Т. (2021). Поширення та етіологія маститів корів у фермерському господарстві. *Conference "Modern Methods of Diagnostic, Treatment and Prevention in Veterinary Medicine*, 142–143. Retrieved from <https://nvlvet.com.ua/index.php/conference/article/view/4538>.

10. Suprovych, Tetiana, & **Stroyanovska, Lilia**. (2022). Application of liposomal preparation in the treatment of clinical mastitis in cows. «Світ наукових досліджень. Випуск 13»: матеріали Міжнародної мультидисциплінарної наукової інтернет-конференції, 201–203. Retrieved from <https://www.economy-confer.com.ua/full-article/3969/>

11. Suprovych, Tetiana, & **Strojanovska, Lilia** (2023). Cellular and humoral factors of natural immunity of cows with subclinical mastitis under the influence of liposomal preparation. «Світ наукових досліджень. Випуск 17», матеріали Міжнародної мультидисциплінарної наукової інтернет-конференції, 228–231.

Retrieved from <http://www.economy-confer.com.ua/art/18/116/1061/0/>

12. **Строяновська, Л.В.** (2024). Застосування ліпосомального препарату при лікуванні субклінічної форми маститу в корів. *Materials «The IV International Scientific and Practical Conference «Innovative research and perspectives of the development of science and technology»*, 389–391. Retrieved from <https://eu-conf.com/events/innovative-research-and-perspectives-of-the-development-of-science-and-technology/>

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	15
ЗМІСТ	17
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Соціально-економічні аспекти виробництва молока та вплив на нього захворювань молочної залози корів	26
1.2. Мікробіоценози, які обумовлюють запалення молочної залози корів	30
1.3. Поширеність, патогенез та імунобіологічна реактивність організму корів хворих на клінічний та субклінічний мастит	34
1.4. Профілактичні та лікувальні заходи за умов активної резистентності основних збудників маститу корів до антибактеріальних препаратів.....	40
1.5. Перспективність використання ліпосомальних препаратів.....	47
1.6. Ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату.....	50
1.7. Висновки з огляду літератури	52
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	54
2.1. Схема проведення досліджень	54
2.2. Методи досліджень морфологічних показників крові	59
2.3. Методи досліджень імунологічних показників кров	61
2.4. Методи досліджень біохімічних показників крові.....	65
2.5. Виявлення алелів гена BoLA-DRB3 асоційованих з соматичними клітинами молока методом ПЛР-ПДРФ	69
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	73
3.1. Моніторинг захворюваності корів на мастит в господарствах Хмельницькій області.....	73
3.1.1. Характеристика виробничої діяльності, молочної галузі та захворюваності корів на мастит у ТОВ НВА «Перлина Поділля».....	77

3.1.2. Підприємницька діяльність, виробництво молока та захворюваність корів на мастит в ФГ «Подільська марка»	80
3.2. Мікробіоценози за клінічного та субклінічного маститу у корів ..	84
3.3. Вплив ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на біохімічні показники крові та імунобіологічну реактивність організму корів за катаральної форми маститу	90
3.3.1. Вплив ліпосомального препарату на основі ЕТС на морфологічні та біохімічні показники крові корів хворих на катаральний мастит	90
3.3.2. Вплив ліпосомального препарату на основі ЕТС на клітинний і гуморальний імунітет корів хворих на катаральний мастит	96
3.4. Вплив ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на біохімічні показники крові та імунобіологічну реактивність організму корів за субклінічного маститу	103
3.4.1. Морфологічні та біохімічні показники крові корів хворих на субклінічний мастит	103
3.4.2. Вплив ліпосомального препарату на основі ЕТС на клітинний і гуморальний імунітет корів з субклінічним маститом ..	110
3.5. Зв'язок між алелями гена BoLA-DRB3 та кількістю соматичних клітин у молоці корів з субклінічним маститом	115
3.6. Терапевтична ефективність застосування препарату у формі ліпосомальної емульсії на основі етилтіосульфанілату коровам хворим на катаральний і субклінічний мастит	119
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	121
ВИСНОВКИ	140
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	142
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	143
ДОДАТКИ	173

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

- АФО – активні форми Оксигену
- БАСК – бактерицидна активність сироватки крові
- ВГ – відновлений глутатіон
- ГКГ – головний комплекс гістосумісності ВРХ
- ГП – глутатіонпероксидаза
- ГПЛ – гідропероксида ліпідів
- ЕАС-РУЛ (В-РУЛ) – В-лімфоцити індикаторних клітин
- ЕБ – еритроцити барана
- ЕТС – етилтіосульфат
- ЖК – жирні кислоти
- ІРІ – імунорегуляторний індекс
- КАТ – каталаза
- КСК – кількість соматичних клітин
- ЛАСК – лізоцимна активність сироватки крові
- МДА – малоновий діальдегід
- ОМП – окисна модифікація протеїнів
- ПЛР-ПДРФ – поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів
- ПОЛ – перекисне окислення ліпідів
- СОД – супероксиддисмутаза
- САЗ – система антиоксидантного захисту
- ТА-РУЛ – кількість активних розеткоутворюючих Т-лімфоцитів
- ТБК-активні продукти – тіобарбітурова кислота
- ТЕ-РУЛ – загальна кількість розеткоутворюючих Т-лімфоцитів
- Th – Т-лімфоцити-хелпери (теофілінрезистентні)
- Ts – Т-лімфоцити-супресори (теофілінчутливі)
- ЦІК – циркулюючі імунні комплекси

ВСТУП

Актуальність теми. Мастит корів є однією з найбільш поширених і дорогих хвороб молочної худоби у всьому світі. Запалення молочної залози значною мірою впливає на виробництво молока та якість продукції, здоров'я та добробут тварин, економічний прибуток молочної промисловості та здоров'я населення. Економічні втрати спричинені лікуванням, втратою виробництва, зміною якості продукції, викинутим молоком, додатковою працею, вибракуванням, поганим добробутом тварин та ризиком інших захворювань. У світовій молочній промисловості загальні річні витрати, пов'язані з маститом корів оцінюються від 19,7 до 32 мільярдів доларів США [129, 144, 161]. Один випадок клінічного маститу може призвести до економічних втрат, які коливаються від 128 до 444 доларів [135, 206].

Дослідженню етіологічних факторів маститу корів присвячені роботи багатьох вчених. З вимені хворих на мастит корів виділено понад 120 видів різних мікроорганізмів. Найпоширенішими ізолятами, які виділяються при клінічній та прихованій формами маститу є *Staphylococcus aureus* та коагулазонегативні стафілококи, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma bovis* [72, 102, 170, 191, 259]. *Staphylococcus aureus* є важливим збудником контагіозних інтрамаммарних інфекцій молочної худоби. Його здатність зберігатися у вимені ґрунтується на наявності важливих механізмів, таких як його можливість утворювати біоплівки, полісахаридні капсули, варіанти невеликих колоній. Утворення біоплівки вважається селективною перевагою для патогенів, що викликають мастит, яка сприяє стійкості бактерій у молочній залозі [112, 265].

Симптоми клінічного маститу у корів включають зміни фізико-хімічного та мікробіологічного складу молока та патологічні зміни в епітелії залоз [73]. При запаленні молочної залози в крові відбуваються певні зміни метаболічного гомеостазу та імунної реактивності організму тварин. З'являється дисфункція пероксидного окиснення ліпідів та зниження антиоксидантного захисту [41].

Для лікування субклінічного і катарального маститу корів здебільшого застосовують інтрацистернальне введення протимікробних і сульфаніламідних

препаратів, при потраплянні яких у дійкову цистерну вим'я відбувається розвиток резистентних до антибіотиків патогенів. До того ж, катетеризація часто травмує слизову оболонку цистерни та ускладнює запальний процес [8].

Заборона на використання антибактеріальних препаратів для дійних корів примушує до пошуку нових ефективних та безпечних засобів. До альтернативних методів лікування запальних процесів молочної залози належить використання пробіотиків [171, 222], фітопрепаратів [40, 164, 264], препаратів на основі йоду [105], бактеріофагів [84, 131], ліпосомальних препаратів [51, 85, 236] тощо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в Подільському державному аграрно-технічному університеті (Заклад вищої освіти «Подільський державний університет») на кафедрі гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України протягом 2021 – 2023 років за ініціативною тематикою «Імунобіологічна реактивність організму корів із клінічним та субклінічним запальним процесом молочної залози за дії ліпосомальних препаратів», номер державної реєстрації 0124U002297.

Мета і задачі досліджень. Мета роботи полягала у з'ясуванні мікробіологічних, біохімічних та імунологічних особливостей гомеостазу в організмі хворих на мастит корів за впливу ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату та визначенні можливості використання ДНК-маркерів асоційованих з кількістю соматичних клітин молока у профілактиці цього захворювання.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

- вивчити поширеність маститу корів у господарствах Хмельницької області;
- дослідити особливості захворювання корів на запальні процеси молочної залози в умовах господарств Хмельницької області;
- ідентифікувати мікробіоти секрету молочної залози корів за катарального і субклінічного маститу та визначити чутливість до антибактеріальних препаратів основних збудників захворювання;
- визначити морфологічні параметри, біохімічний профіль та стан

клітинної і гуморальної ланок імунітету у крові хворих на катаральний і субклінічний мастит корів;

– з’ясувати вплив нового комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів і білків, активність ензимів системи антиоксидантного захисту, стан природного й адаптивного імунітету у корів за клінічної і субклінічної форми маститу;

– визначити терапевтичну ефективність застосування ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату за клінічного та субклінічного перебігу захворювання;

– встановити можливість використання алельного поліморфізму гена BoLA-DRB3 для визначення асоціативних зв’язків в системі «алель -КСК».

Об’єкт досліджень: клінічний та субклінічний мастит корів, імунобіологічна реактивність та антиоксидантна система захисту організму корів за умов маститу, способи їх корекції ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату, асоціації поліморфізму алелів гена BoLA-DRB3 з соматичними клітинами молока.

Предмет досліджень: мікробіологічний склад збудників маститу корів, гематологічний, біохімічний профіль крові та показники клітинної і гуморальної ланки імунітету у хворих на мастит корів за умов застосування ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату, соматичні клітини молока. алелі гена BoLA-DRB3.

Методи досліджень: бактеріологічні (виділення та ідентифікація збудників маститу, визначення їх чутливості до антибактеріальних препаратів), клінічні (виявлення клінічного і субклінічного перебігу маститу), лабораторні (визначення кількості соматичних клітин молока), гематологічні (формені елементи крові, гемоглобін, лейкоцитарна формула), імунологічні (показники клітинного та гуморального імунітету), біохімічні (активність ензимів, продукти пероксидного окиснення ліпідів і протеїнів), молекулярно-біологічні (ПЛР-ПДРФ), статистичні (розрахунки виконано стандартному пакеті IBM SPSS Statistics V28.0 з використанням власних програм та інтегрованої надбудови GenAlEx на основі стандартного одноразового плану спостереження, показників відносного ризику, статистичної оцінки гіпотез за критерієм Пірсона χ^2 , та

одновибірковим t-критерієм Стюдента при рівні значущості $P < 0,05$).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексні дослідження, що характеризують мікробіологічні, біохімічні та імунологічні особливості гомеостазу організму корів за клінічного і субклінічного перебігу запальних процесів молочної залози у корів і показано ефективність нового ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату за внутрішньом'язового його введення. Доповнено дані щодо характеристики мікробіоти секрету молочної залози у корів за клінічного і субклінічного перебігу маститу та чутливості основних збудників захворювання до сучасних антибактеріальних препаратів.

Доведено нормалізуючий вплив компонентів нового комплексного ліпосомального препарату (з концентрацією ЕТС 1,25%) на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів і окисної модифікації протеїнів, активність ензимів антиоксидантного захисту, активність клітинної і гуморальної ланок природного і адаптивного імунітету в крові хворих на катаральний і субклінічний мастит корів.

Вперше для популяції корів української чорно-рябої молочної породи виявлено вірогідний зв'язок алелів гена BoLA-DRB3 з соматичними клітинами молока. Встановлено асоціацію алеля BoLA-DRB3.2*22 з високою та алеля BoLA-DRB3.2*24 – низькою КСК у молоці корів.

Наукова новизна підтверджена деклараційним патентом на корисну модель № 151429 (додаток 1).

Практичне значення отриманих результатів. Використання нового комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату активно впливає на приведення до фізіологічної норми гематологічного, біохімічного та імунологічного профілю крові хворих на клінічний і субклінічний мастит корів, що має практичне значення і може використовуватися як альтернативний метод його лікування у корів.

Практичне значення отриманих результатів підтверджено актами впровадження у виробництво від 12.12.2023, 20.12.2023 року (додатки 2 і 3).

Результати роботи використовуються в навчальному процесі при підготовці фахівців ОР «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і

природокористування України, Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького та Одеському державному аграрному університеті (додатки 4 – 6).

Особистий внесок здобувача. Здобувачка самостійно провела огляд та аналіз наукової літератури за темою дисертації, опрацювала первинні дані, розробила схему та методологію досліджень, реалізувала всі заплановані клінічні, бактеріологічні та лабораторні дослідження, виконала математичний і статистичний аналіз отриманих результатів, підготувала до друку публікації за темою дисертації. Під керівництвом наукового керівника було обґрунтовано тему і концепцію дисертаційної роботи, сформульовано основні положення висновків і практичних рекомендацій. Ряд досліджень здобувачкою здійснено разом із співавторами окремих публікацій, включених до списку робіт дисертаційної роботи, яким висловлюємо щиру вдячність.

Апробація результатів дисертаційних досліджень. Матеріали роботи було представлені на засіданнях науково-технічної ради закладу вищої освіти «Подільський державний університет» та наукових конференціях: II конференція «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» присвяченій 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові» (Львів, 2021), Міжнародна мультидисциплінарна наукова інтернет-конференція «Світ наукових досліджень». (м. Тернопіль, Україна – м. Переворськ, Польща, 2022), Міжнародна мультидисциплінарна наукова інтернет-конференція «Світ наукових досліджень». (м. Тернопіль, Україна – м. Переворськ, Польща, 2023), IV International Scientific and Practical Conference (2024) Stockholm, Sweden.

Публікації. За темою виконаного в дисертації дослідження видано 12 наукових праць, із них 2 статті у виданнях проіндексованих у базах даних Scopus/WoS: 4 статті у фахових наукових виданнях України (категорія Б), 1 – патент України на корисну модель, 1 – колективна монографія, 4 праці – у матеріалах конференцій.

Структура і обсяг роботи. Дисертацію викладено на 181 сторінці тексту комп'ютерного набору. Робота містить наступні розділи: анотації (українською

та англійською мовами), вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, їх аналіз та узагальнення, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел літератури, додатки. Список використаних літературних джерел нараховує 268 робіт. Дисертація ілюстрована 16 рисунками, містить 43 таблиці та 6 додатків. Додатки містять копії патенту на корисну модель, акти виробничих випробувань ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату у дослідних господарствах та актів впровадження в освітній процес закладів вищої освіти.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Соціально-економічні аспекти виробництва молока та вплив на нього захворювань молочної залози корів

Серед первинних фізіологічних потреб людини однією з головних є забезпечення продуктами харчування. В офіційному релізі ООН вказано що населення Землі перевищило відмітку у 8 млрд. осіб в кінці 2022 року. Останній мільярд було подолано лише за 11 років [247]. Підраховано, що за 70 років життя людина випиває 50 тон води, з'їдає 2,5 тони білків, 2,3 тони жирів, понад 10 тон вуглеводів і майже 300 кілограмів солі [78]. Молочні продукти є багатим джерелом необхідних білків і мінералів, включаючи кальцій, калій, цинк і фосфор, забезпечуючи більше мікроелементів і кілокалорій, ніж будь-яка інша натуральна їжа в раціоні людини [209]. Одним з основних джерел отримання харчового білку є молоко і молочні продукти. За оцінками Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO 2019), понад 80% населення світу регулярно споживає молочні продукти. В 2020 році загальне виробництво всіх видів молока зросло до 907 млн. тон [111]. Виробництво коров'ячого молока становить близько 80% від загального виробництва молока у світі і в 2022 сягнуло 757 млн. тон. В середньому, споживання молочних продуктів на душу населення становило 116,9 кг у молочному еквіваленті [233].

Найбільше сучасна молочна галузь потерпає від маститів. Це захворювання є основним фактором, що призводить до зниження виробничих показників (зменшення надоїв до 30%) і деградації якості молока. Воно втрачає свої поживні якості, стає непридатним для переробки і становить загрозу здоров'ю споживачів. Бички і телички, яких випоювали молоком від хворих на мастит корів, відставали у розвитку, страждали від дисбактеріозу, що часто призводило до їх загибелі. Корови, які перехворіли в ранньому віці, мали меншу молочну продуктивність (на 20–30%), ніж здорові тварини. Секрет молока від хворих корів містить патогени, які негативно впливають на якість молочної продукції [48, 80, 88, 129, 140, 155, 176]. Мастит має важливе значення в контексті One Health, тому що

молочна інфекція негативно впливає не тільки на здоров'я та благополуччя молочного стада. В деяких випадках існує ймовірність передачі людині з молоком бактерій стійких до антибіотиків, які широко застосовуються для лікування маститів, що супроводжується захворюваннями у людей та їх несприйнятливістю до терапії, пов'язаної з антибіотиками [109, 232].

В одному із останніх оглядів захворювань молочної залози наголошується, що добова втрата молока на фермах ВРХ пов'язаних з маститами складає від 1,0 до 2,5 л на протязі перших двох тижнів після ініціації хвороби, що за лактацію призводить до втрат від 110 до 552 літрів [220].

Проблеми з маститом корів спостерігаються у всіх без винятку країнах виробниках молока та молочної продукції, з яких найбільшим світовим продуцентом є Індія. В країні нараховується понад 300 мільйонів корів і виробляється близько чверті (230,6 млн тон) світового виробництва молока. Однак, проблеми з маститами теж є найбільшими. Поширеність субклінічного маститу у ВРХ в Індії коливається від 9,9 до 86,9%. Середнє падіння доходу через мастит становить від 306–335 до 413–458 рупій на корову в день [69, 225].

Середня вартість збитків через мастит ВРХ за рік оцінюється в \$147 (11% – 18% валового прибутку) на кожну корову, особливо через втрати у виробництві молока та із-за вибракування тварин. У США підраховали, що щорічно через мастит втрачають у молочній галузі 2 мільярди доларів [84].

Канадській молочній промисловості мастит коштує щорічно 400 мільйонів CAD (\$310 мільйонів) або приблизно 500–1000 CAD (\$385–770) на корову. Для типової канадської молочної ферми фінансові збитки складали 662 CAD на дійну корову на рік. Для субклінічних маститів двома найважливішими складовими втрат були зниження надоїв і вибракування корів (72 і 25%, відповідно). Для клінічних форм головними компонентами втрат були вибракування (48%), зниження надоїв (34%) і втрата зараженого молока (11%) [57].

Підраховано, що через мастит в Австралії щороку втрачається понад 130 мільйонів доларів (200 доларів на корову/рік) [142].

Молочний сектор є лідером сільськогосподарської економіки Європейського Союзу (ЄС). У 2020 році молочні фермери в ЄС виробили 154 мільйони тон коров'ячого молока. Але збитки від маститів знаходяться на високому рівні.

Наприклад, щорічні втрати від маститу в Німеччині оцінюються в 1,4 млрд. євро, що складає 4,7 центів на кг молока. Кожен субклінічний мастит коштує щонайменше 250 євро, а важкий клінічний мастит – близько 500 євро на корову за лактацію. Втрата молока в обсязі від 27 до 52% і забракованого молока в розмірі від 13 до 30% були найдорожчими витратами, пов'язаними з маститом [97, 262].

Незважаючи на відносно гарне здоров'я вим'я па швейцарських фермах, національні щорічні витрати від маститу становлять приблизно 129 мільйонів швейцарських франків або 198 франків на одну корову за рік. Для підприємств, які переробляють молоко збитки складають 1545 млн. євро. Кожна п'ята корова хвора на гострий мастит, кожна 4-та корова має хронічне запалення принаймні в одній чверті вим'я, а одну з семи молочних корів виключають зі стада через невиліковний мастит [126, 213].

Дослідження в Данії показали, що витрати на мастит варіювали від 149 до 570 євро на один випадок маститу при захворюваності від 3 до 5% за лактацію, залежно від збудника маститу [229]. У Фінляндії оціночні витрати на мастит склали 458 євро на один випадок захворювання або 147 євро на одну корову на рік, при відповідній захворюваності на клінічний мастит від 31 до 38% на корову на рік, залежно від типу породи [249].

В Україні мастити ВРХ також займають головне місце серед захворювань, які створюють глобальні проблеми галузі тваринництва. Значне поширення захворювань молочної залози серед корів призвело до значних економічних втрат для молочної та переробної промисловості, що є наслідком зниження продуктивності та погіршення якості молока та молочних продуктів. За оцінками, захворюваність великої рогатої худоби в середньому становить 30%. У певних випадках, таких як порушення умов утримання та годівлі, неналежне ветеринарне обслуговування та відсутність ефективних методів розведення, поширеність маститів діагностується постійно [37, 43]. Середні значення захворюваності маститами сягають при клінічних формах до 10% і при субклінічних формах до 25%. В окремих неблагополучних регіонах цей показник може складати до 70% [3, 13, 23, 46, 188].

Серед порід найбільша кількість маститів визначається у корів української чорно-рябої молочної породи. Загальна частка тварин даної породи хворих на

мастит сягає майже 35%, в тому числі, для випадків субклінічної (27,3%) і клінічної (12,6%) форм захворювання [30]. У корови, яка перехворіла, надій за лактацію при переході хвороби в хронічну форму скорочується на 150 – 200 кг, що разом зі збитками від вибраковування тварин еквівалентно втратам молочної продуктивності в межах 10 – 15 % від річного надою [24].

Аналіз захворюваності корів на мастит по країні загалом та за окремим регіонами проведено за результатами дослідження понад 60 літературних джерел, де опрацьовано статистичні дані щодо захворюваності корів за породами, та поширення захворювання в різних регіонах країни [44]. Результати розповсюдження патології молочної залози для найбільш поширених порід показано в табл.1.1.

Таблиця 1.1

Узагальнені дані розповсюдження маститу корів для найбільш поширених в Україні порід

Породи	Всього захворювань на мастит			Субклінічний мастит		
	обстежено	хворих	%	обстежено	хворих	%
всі породи	31258	9172	29,8	21942	5182	23,6
чорно-ряба	2737	950	34,7	2822	770	27,3
чорно-ряба молочна	4688	1431	30,5	3459	781	22,6
чорно-ряба разом	7425	2381	32,1	6281	1551	24,7
червоно-ряба молочна	1545	445	28,8	1545	389	25,2
голштинська	3324	960	28,9	1982	476	24,0

Примітка. Розміри вибірок залежать від повноти приведених даних в літературних джерелах

Важливим аспектом дослідження була статистика розповсюдження маститів корів в різних регіонах країни (рис.1.1).

Найбільш проблемним виявився Центральний регіон, в якому виявлено майже 43% захворювань молочної залози. Західний регіон, де проведено дослідження має помірний рівень захворюваності, співставний з іншими регіонами, такими як Східний та Південний, з ступенем виявлених патологій на рівні 25%.

Дані інших досліджень підтверджують попередні результати. Так у роботі Сачука показано, що у 39,3% корів господарств Рівненської та 50,7% Хмельницької областей діагностували запалення вим'я. Серед хворих на мастит

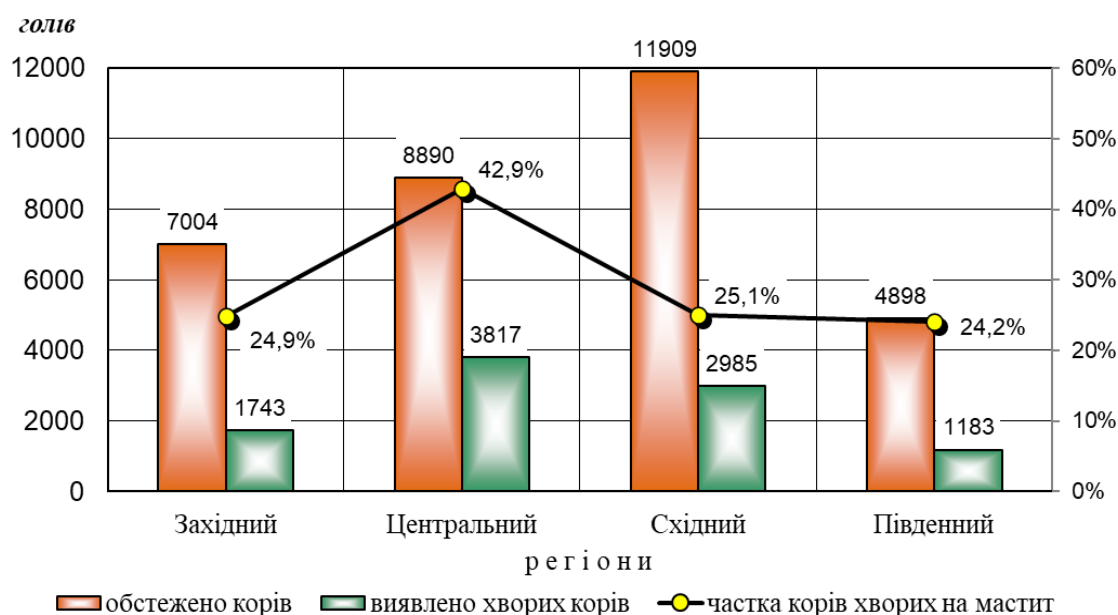


Рис.1.1. Поширення маститу корів у різних регіонах України

корів субклінічний перебіг виявлено у 26,3 і 29,9%, а клінічний – у 13 і 20,8%, відповідно [38]. Приведені дані досить релевантно корелюють з даними поширення маститів для Західного регіону. В роботі Горюк та інш. показано, що поширення субклінічного маститу корів на молочних фермах західних областей України в лактаційний період склало $24,6 \pm 2,5\%$, а в сухостійний – $38,5 \pm 3,8\%$ ($P \leq 0,01$ – стосовно до лактаційного періоду) [132].

1.2. Мікробіоценози, які обумовлюють запалення молочної залози корів

Мастит – це запалення молочної залози, зазвичай бактеріального походження, хоча на розвиток запалення можуть впливати і фізичні фактори (механічні травми, умови навколишнього середовища). Дане запалення є поліетіологічним і поліфакторним та зумовлюється сукупністю механічних, хімічних, біологічних, стресових та інших впливів на молочну залозу корови або на її організм в цілому.

Сумарно перераховані фактори зумовлюють різні підходи до класифікації маститів. За клінічними ознаками та характером запального процесу виділяють шість наступних форм: серозний, катаральний, фібринозний, гнійний, геморагічний та специфічний. Досить часто фіксуються варіанти складного перебігу захворювання, коли одна форма маститу може переходити в іншу. В

таких випадках йдеться про асоційований мастит: серозно-катаральний, серозно-фібринозний, гнійно-фібринозний тощо [56].

Мікроорганізми, які найчастіше викликають мастит, можна розділити на дві великі категорії: інфекційні патогени, які поширюються від корови до корови, головним чином під час процесу доїння, і патогени навколишнього середовища, які зустрічаються у всьому середовищі існування молочних корів [87, 92, 221]. Головна роль належить галактогенному проникненню, при якому збудники попадають у вим'я із зовнішнього середовища через дійковий канал, чому сприяє забрудненість молочної залози мікроорганізмами (рис.2.1).

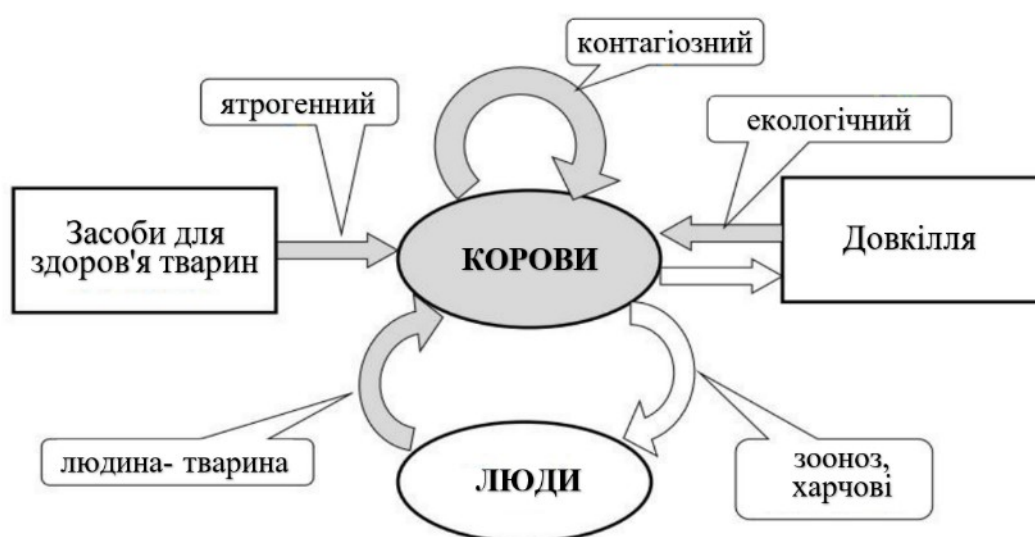


Рис.1.2. Можливі джерела та шляхи передачі збудників маститу [178].

Переважаючими інфекційними збудниками є *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* та *Corynebacterium bovis*, тоді як переважаючими збудниками навколишнього середовища є *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* та інші грампозитивні мікроорганізми. Стафілококи, крім *Staphylococcus aureus*, які раніше описували як коагулазонегативні стафілококи, також є важливими патогенами молочних залоз. Однак епідеміологія останніх патогенів все ще досліджується та варіюється залежно від виду стафілококів, причому деякі види, можливо, є більш опортуністичними патогенами, а інші, ймовірно, є патогенами, адаптованими до господаря [17, 100, 217].

Молоко, компонент здорових клітин вим'я, колонізується патогенними бактеріями з різних джерел. Висока поживна цінність коров'ячого молока в поєднанні з його майже нейтральним рН створює сприятливе середовище для

розвитку численних мікроорганізмів. Відомо, що понад 100 різних мікроорганізмів із зовнішнього середовища. Патогенні стрептококи та стафілококи вважаються найчастішими мікробними клітинами, які присутні в 75 – 90% випадках у секреті хворої чверті вим'я [26, 127].

У літературі є повідомлення про виділення із секрету вим'я хворих на мастит корів сальмонел і лістерій, мікобактерій, нокардій, аеромонад, клебсієл, вірусів ринотрахеїту і вульвовагініту, бацил, лептоспир, пептококів, мікрококів, гемофільної палички, мікоплазм, синьогнійної палички, грибів [214, 248, 257].

Існує велика кількість наукових праць присвячених виділенню та дослідженню бактеріального фону інтрамамарних інфекцій. Так, при дослідженні проведеному в штатах Теннессі, Кентуккі та Міссісіпі (США) було отримано 193 ізоляти бактерій від 151 корови, з яких 58,3% мали субклінічний, решта клінічний мастит. Із субклінічних та клінічних випадків маститу виділено 60,1% та 39,9% бактерій, відповідно. Більшість *Staphylococcus aureus* (90,9%), *Klebsiella pneumoniae* (61,5%) і *Streptococcus uberis* (7,5%) виділено у випадках субклінічного маститу, тоді як більшість *E. coli* (79,4%), *Klebsiella oxytoca* (75%) та *Streptococcus dysgalactiae* (52,8%) були виділені у випадках клінічного маститу. Відповідно, основні види збудників бактерій в порядку спадання, включали *Staphylococcus aureus* (34,2%), *Streptococcus uberis* (20,7%), *Staphylococcus dysgalactiae* (18,7%), *E. coli* (17,6%), *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* (6,7%) і *Klebsiella oxytoca* (2,1%) [55].

Відповідно до звіту мета-аналізу виконаного індійськими дослідниками з 2005 по 2016 роки сумарна поширеність субклінічного і клінічного маститу, отримана від 32 442 молочних тварин, становила 41% та 27%. Зведена оцінка поширеності *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* та *Escherichia coli* була на рівні 45%, 13% та 14%, відповідно. Аналіз за періодами виявив збільшення *Staphylococcus sp.* при субклінічному маститі, тоді як поширеність *E. coli* при клінічних формах зменшилася [147].

Науковці з Фінляндії підтвердили, що в 240 тис. щоквартальних проб молока від 93 хворих на мастит молочних корів із загальної експериментальної групи у 529 тварин виявлено наступне: у 49% позитивних зразків був присутній лише один збудник, в 19% – два види з одним домінуючим видом і лише у 12%

зразків не було виявлено ДНК цільового збудника. Найпоширенішими видами у зразках з одним видом були коагулазонегативні стафілококи (CNS) (43%), за ними йшли *Staphylococcus aureus* (21%), *Streptococcus uberis* (9%), *Streptococcus dysgalactiae* (8%), *Corynebacterium bovis* (7%) та *Escherichia coli* (5%) [249].

Із 208 клінічних проб молока корів хворих на мастит (провінція Цзянсу, Китай) патогенні бактерії були виявлені в 89,4% зразків. Всього було виявлено 438 ізолятів для 16 видів бактерій. Серед них більшість становили екологічні патогенні бактерії навколишнього середовища. Найвищу частку являли патогени *K. pneumoniae* (15,4%), далі *E. coli* (13,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (12,3%) і *Streptococcus agalactiae* (10,5%) [82].

Протягом 2013 – 2018 рр. у Швеції було зібрано зразки клінічних маститів разом із інформацією про корів та стада походження. Загалом досліджено 664 бактеріальних ізолятів. *Staphylococcus aureus* був найпоширенішим патогеном (27,8% діагнозів), за ним йшли *Streptococcus dysgalactiae* (*Staphylococcus dysgalactiae*) (15,8%), *Escherichia coli* (15,1%), *Streptococcus uberis* (11,4%), *Trueperella pyogenes* (7,7%), non-aureus staphylococci (NAS) (2,8%), *Klebsiella spp.* (2,7%), *Enterococcus spp.* (1,3%), *Streptococcus agalactiae* (1,2%). Інші бактерії становили 2,6% [101].

В Україні приділяється значна увага щодо вивчення етіології маститу корів. Так, за результатами мікробіологічного аналізу сирого молока та молочних продуктів приватного виробництва, які реалізуються на агропродовольчих ринках України встановлено, що бактерії роду *Staphylococcus* виділяються у 80,3 – 93,3% випадків з сирого молока та молочних продуктів. Коагулазопозитивні види стафілоkokів були виділені зі сметани у 57,8% випадків, що в 1,7 рази більше порівняно зі зразками сирого молока і в 2,5 рази більше порівняно з сиром. Ще два біотики золотистого стафілокока *Staphylococcus aureus var. bovis* та *Staphylococcus aureus var. hominis* виявлені в сирому молоці та молочних продуктах домашнього виробництва, які реалізовувалися на ринках. При цьому $46,6 \pm 3,1\%$ виділених культур були віднесені до біотипу *Staphylococcus aureus var. bovis*, а $53,4 \pm 3,7\%$ – до людського ековару [151].

Встановлено, що в період лактації з секрету хворої чверті вимені корів найчастіше виділяють бактерії роду *Streptococcus* (47,7%) та *Staphylococcus*

(45,5%), що вказує на їхню домінуючу етіологічну роль у виникненні субклінічного маститу. Також у лактаційний та міжотельний періоди реєстрували субклінічний мастит змішаної етіології (стрептококи, стафілококи, кишкові палички), відповідно, у 6,8 та 8,3% випадків. На молочних фермах домінували коагулазопозитивні стафілококи *S. aureus subsp. aureus*. При субклінічному маститі стрептококової етіології в період лактації в однаковій кількості зразків секрету вимені виділяють бактерії видів *S. agalactiae* та *S. dysgalactiae* (по 47,4%), меншою мірою *S. uberis* (5,2%) [39, 173].

Перераховані в огляді збудники не завжди є найпоширенішими в кожній місцевості та в кожному стаді. Незважаючи на їх строкатість та неоднорідність розповсюдження за регіонами необхідно відзначити, що найбільш контагіозними патогенами, які викликають інтрамаммарне запалення, є *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* і *Streptococcus uberis* [217]. Якщо 15 – 20 років тому мастити стафілококової етіології в загальній кількості захворювань вимені займали 10 – 20 %, то нині цей відсоток у деяких країнах збільшився до 50 – 60% і більше [64]. Крім того, *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus agalactiae*, інколи класифікуються як патогени навколишнього середовища, коли зазвичай в літературних джерелах їх відносять до збудників контагіозного маститу. Ця версія підтверджується можливістю передачі патогенів кількома шляхами: заразне молоко від інфікованих корів, погана гігієна під час доїння, а також через підстилку, фекалії, сечу та інші забруднення [196, 221].

1.3. Поширеність, патогенез та імунобіологічна реактивність організму корів хворих на клінічний та субклінічний мастит

Відповідно до клінічної симптоматики мастит класифікують на клінічний та субклінічний [56, 87, 251]. Деякі автори до даної систематики додають хронічний мастит, хоча його швидше за все треба класифікувати, як різновид клінічної форми захворювання.

Оскільки мастит є мультифакторним захворюванням, сприйнятливість до нього зумовлена багатьма чинниками, такими як умови утримання, режим доїння, порода корів, стан тіла, морфологія вим'я, вік корови, стадія лактації та

продуктивність тощо. До основних факторів необхідно віднести імунологічний стан та реактивність молочної залози. Тому, клініка та перебіг маститу залежить від взаємодії між природною резистентністю та набутим імунітетом корови, а також видом, концентрацією та вірулентністю патогенів, які викликають запалення вим'я [267].

Клінічний мастит у корів характеризується раптовим початком з почервонінням і набряком вим'я. Молоко ураженої чверті змінене, містить пластівці або згустки та/або має водянисту консистенцію. Корови можуть бути помітно млявими, мати поганий апетит і зазвичай лихоманку [55, 97, 114, 125, 140]. Клінічний мастит в залежності від симптоматики, перебігу та наслідків захворювання поділяють на гострий, підгострий і хронічний.

Клінічний гострий мастит (проявляється швидким початком сильного запалення, болю та системних симптомів, що призводить до тяжкого захворювання корови протягом короткого часу. Підгострий варіант – найбільш поширена форма клінічного маститу, яка уражає приблизно 10–50% стада і характеризується місцевими ознаками легкого запалення вим'я та видимими змінами в молоці, наприклад невеликими згустками. Середня тривалість від 8 до 15 діб. Хронічний мастит – це тривалий рецидивуючий і постійний випадок. Його перебіг часто призводить до незворотного ураження вим'я від повторного запалення і вибракування корів [76, 103, 142].

Субклінічний (прихований) мастит (*mastitis latentus*) – запальний процес, при якому майже відсутні клінічні ознаки, але спостерігається зниження секреторної властивості вим'я у період лактації та зміни фізико-хімічних властивостей і клітинного складу молока (збільшення соматичних клітин). Візуально молоко має звичайну консистенцію та колір, а інші ознаки, характерні для хворої тварини, малопомітні або взагалі відсутні. Ознакою субклінічного маститу є прояв дисфункції молочної залози, яка характеризується поступовим зниженням молочної продуктивності. При уважному обстеженні вим'я можна помітити асиметрію чвертей та потовщення стінок дійки. Звуження цівки молока при доїнні вказує на зменшення діаметру дійкового каналу. На пізніх стадіях спостерігається погіршення органолептичних якостей молока, включаючи зниження кальцію, фосфору, білка, жиру та збільшення хлориду натрію [136, 182].

У здорових лактуючих корів макрофаги є домінуючим типом клітин, які зустрічаються в молоці та тканинах молочної залози. Коли бактерії потрапляють у молочну залозу через дійковий канал, вони розмножуються в молоці, посилюючи запальну реакцію. Бактеріальні токсини, ферменти та компоненти клітинної стінки можуть мати прямий вплив на функцію епітелію молочної залози, стимулюючи вироблення численних посередників запалення патогенами, які можуть брати безпосередню участь у механізмі розвитку захворювання. Найбільш поширені медіатори – простагландини, серотонін, гістамін, компоненти комплементу та цитокіни, такі як фактор некрозу пухлини, інтерлейкін-1, інтерлейкін-6, інтерлейкін-8 тощо. Біологічно активні сполуки мають різну локальну активність в інфікованих тканинах, які спрямовують рух і локалізацію нейтрофілів (та інших лейкоцитів) з крові в молоко, що у підсумку призводить до збільшення кількості соматичних клітин. Соматичні клітини молока в основному складаються з лейкоцитів та епітеліальних клітин, а їхня кількість є інформативною ознакою бактеріальної внутрішньомолочної інфекції, яка широка використовується в молочній промисловості для визначення товарної якості молока [219, 242].

Вчені активно досліджують як генетичні, так і епігенетичні механізми, які контролюють імунітет. Знання патогенезу дозволяє запобігати поширенню маститів, а у випадку захворювання вибрати правильну стратегію лікування.

Молочна залоза корів оснащена неімунним анатомічним бар'єром і безліччю імуноопосередкованих захисних механізмів, які включають вроджені та адаптивні імунні відповіді. Вроджений імунітет відносно неспецифічний із швидкою кінетикою, тоді як адаптивний імунітет пропонує високоспецифічну відповідь із відносно сповільненою кінетикою. Вроджений захист хазяїна залежить від рецепторів, закодованих зародковою лінією, які розпізнають консервативні структури, що експресуються широким спектром мікробів, і раннього індукованого клітинного та розчинного захисту. Цей природний захист швидко реагує на мікроби на ранніх стадіях інфекції та тісно інтегрований з адаптивною імунною системою [79, 117, 199, 259].

Відмінності стійкості до маститу серед порід великої рогатої худоби підтверджують гіпотезу про те, що генетичні компоненти модулюють ризик захворювання. Спадковість маститу оцінюється нижче рівня 0,05 [177]. Іншими

даними підтверджується, що геномна здатність передбачити клінічний мастит є низькою, лише 0,19 [124]. Це часто інтерпретується як те, що генетика відіграє незначну роль і що покращення менеджменту є єдиним варіантом зниження захворюваності на мастит.

Серед більше ніж двох тисяч потенційних локусів-кандидатів пов'язаних з маститом триває пошук генів-кандидатів, які беруть участь у регуляції процесів, пов'язаних з імунною системою і можуть слугувати маркерами чутливості до маститу [115, 228]. На сьогодні молекулярно-генетичні маркери є головними в галузі генетики тварин, тому що вони дозволяють виявляти поліморфізм на рівні ДНК. Для ВРХ існує досить широкий вибір ДНК-маркерів [224].

Серед них виділяються маркери на основі алелів екзона 2 гена BoLA-DRB3. Унікальність цього гену визначається високим рівнем поліморфізму, що дозволяє використовувати його як високоінформативний маркер для вивчення генетичного різноманіття ВРХ. Поліморфізм екзона 2 цього гену пов'язаний з будовою антигенпрезентуючої щілини і, як наслідок, формуванням імунної відповіді організму на різні види інфекцій, що допускає його використання як маркера чутливості до захворювань [61]. Існує багато досліджень в цьому напрямку. Як ДНК-маркери пов'язані з чутливістю до маститів алелі гена BoLA-DRB3.2 виявлені для багатьох популяцій: голштинської (США, Канада), червоної норвежської, помісі Голштинів та Зебу, різних популяцій єгипетських корів, українських білоголової, червоно-рябої та чорно-рябої молочних порід тощо [99, 120, 152, 153, 212, 234, 238]. Подібні дослідження проведено для виявлення асоціативних зв'язків між схильністю корів до маститів та кількістю соматичних клітин в молоці [42, 47, 86, 95, 218, 219, 254].

Є повідомлення про спроби виявити біомаркери маститу на основі мікроРНК. Відомо про дослідження змін в експресії чотирьох циркулюючих мікроРНК (miR-26-5p, miR-142-5p, miR-146a та miR-223-3p) у різних субпопуляціях імунних клітин в зразках молока від молочних корів, пов'язаних з різною стадією маститу [89].

Розглянемо механізм запального процесу вим'я корови. Патогени через 12 год. після проникнення у чверть викликають запальний процес, який має захисне значення. Після проникнення через цистернальний отвір дійок вони повинні

швидко розмножуватися. Для цього необхідно подолати бар'єр захисного механізму імунітету молочної системи тварини-хазяїна. Як правило, м'язи сфінктера запобігають проникненню патогенних мікроорганізмів, щільно закриваючи цистернальний канал. З внутрішньої сторони канал цистерни вистелений кератином, різновидом білка, що містить воскоподібну речовину, отриману із зовнішнього шару епітеліальних тканин, який має антимікробну активність завдяки вивільненню довголанцюгових жирних кислот. Однак його антимікробна активність є обмеженою [189]. Крім того, важливим аспектом є те, що дійковий канал може залишатися відкритим під час доїння і до 2 годин після нього, оскільки м'язам сфінктера потрібно близько 2 годин, щоб знову затягнути дійковий канал.

Пройшовши через імунний бар'єр патогени розмножуються і виробляють токсини, які сприяють накопиченню лейкоцитів та епітеліальних клітин, що виділяють хімічні атрактанти. У місці інфекції відбувається розгортання різних нейтрофілів, які містять бактерицидні речовини та знищують бактерії і частину епітеліальних клітин, зумовлює зменшення кількості та якості молока [60].

Далі відбувається вивільнення ферментів, таких як N-ацетил-бета-D-глюкозамінідаза (NAGase) та лактатдегідрогеназа (LDH) (рис.1.3).

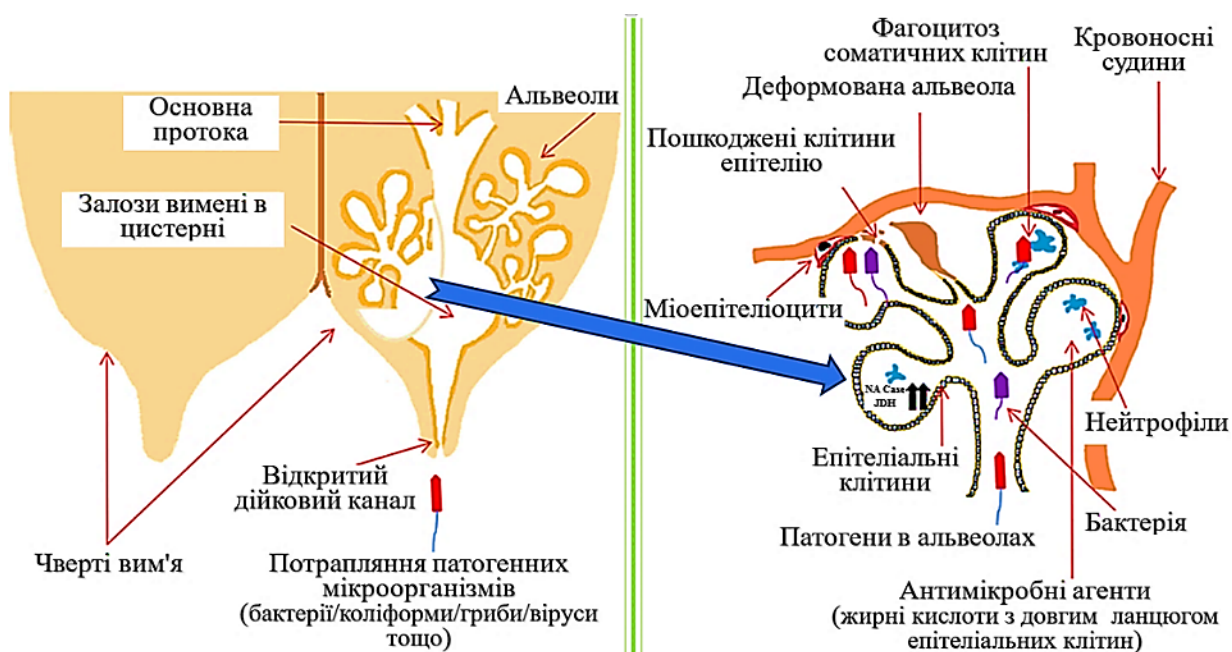


Рис.1.3. Діаграма основних процесів, які відбуваються під час розвитку маститу та реакції імунної системи при вторгненні патогенних мікроорганізмів [60].

Нейтрофіли, що залишилися, зменшуються або шляхом апоптозу, або через

поглинаючи дію макрофагів. Пошкоджені епітеліальні клітини та мертві нейтрофіли вивільняються в молоко, що призводить до росту КСК. У запущених випадках альвеоли можуть бути серйозно пошкоджені, що може призвести до припливу різних іонів у молозиво, тим самим підвищуючи його pH [266].

Вроджений захист від збудників маститу є швидким і включає залучення нейтрофілів до молочної залози для полегшення бактеріального очищення через фагоцитоз, виробництво активних форм кисню, антибактеріальних пептидів, таких як лактоферин і β -лактоглобулін, і дефензинів, що призводить до збільшення кількості соматичних клітин. Відомо, що епітеліальні клітини молочної залози відіграють певну роль у ранніх реакціях через вироблення цитокінів, таких як IL-8 та інших факторів з антимікробною активністю. Якщо бактерії виживають через ці вроджені захисні механізми хазяїна, для усунення інфекції необхідні адаптивні імунні відповіді, опосередковані Т- і В-клітинами [115, 186]. Особливе значення має порівняння реакцій на інфекції *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*, оскільки вони зазвичай асоціюються, відповідно, з гострою/тяжкою та хронічною/субклінічною формами захворювання [259].

Ініціація та регуляція адаптивних імунних реакцій мають вирішальне значення для вирішення проблеми з інфікуванням. Відповідь клітини на зовнішній подразник зазвичай розглядають, як спричинену лігандом активацію рецептора, що стимулює асоційований внутрішньоклітинний сигнальний каскад, який запускає транскрипцію певного набору генів. Недавні дослідження починають відкривати інформацію про епігенетичний вплив на гени імунної відповіді великої рогатої худоби. Клітини вродженої імунної системи розпізнають консервативні молекулярні структури бактерій, пов'язані з патогенами, зв'язуючи рецептори розпізнавання картин на антигенпрезентуючих клітинах, таких як макрофаги та дендритні клітини. Адаптивний імунітет, опосередкований В- і Т-лімфоцитами, розпізнає патогени через високоафінні рецептори [260].

Перекисне окислення ліпідів є одним із найважливіших процесів окиснення в організмі. Перекисне окислення ліпідів – одна з головних причин пошкодження та загибелі клітин внаслідок дії активних форм Оксигену. Негативний вплив на

молочну залозу може ініціювати процес ПОЛ, який є одним із важливих механізмів клітинної патології. Його проміжні та кінцеві продукти (малоновий діальдегід, гідроперекиси ліпідів), які мають цитотоксичні та мутагенні ефекти відіграють певну роль у розвитку патології. Використання індикаторів ПОЛ стало поширеною практикою в дослідженнях оксидативного стресу [10, 67].

Важливе значення при вивченні епігенетичного впливу на перебіг інтрамамарних захворювань відіграє головний комплекс гістосумісності, який виконує важливу роль в індукції та регуляції імунної відповіді [104]. BoLA-система, асоціюється зі стійкістю або сприйнятливістю до маститу [30, 43, 212], кількістю соматичних клітин [42, 47, 55, 86, 95, 218, 219, 254] та імунною відповіддю. Варіабельність у взаємодії хазяїн-патоген контролюється вродженим генетичним складом хазяїна, в тому числі вродженими та адаптивними імунними реакціями, зокрема набутою імунологічною пам'яттю, а також природою мікробного патогену. Сучасні дослідження починають відкривати інформацію про епігенетичний вплив на гени імунної відповіді великої рогатої худоби. Епігенетичне регулювання експресії генів у корів може допомогти пояснити варіації у відповідях на інфекцію та відмінності у сприйнятливості до захворювань. [260].

1.4. Профілактичні та лікувальні заходи за умов активної резистентності основних збудників маститу корів до антибактеріальних препаратів

За останні десятиліття економічні втрати стимулювали глибокі зміни в молочній промисловості розвинених країн світу. Кількість ферм значно зменшилася, а поголів'я збільшилося. Середня продуктивність молока на корову зросла, частково через покращення годівлі та управління, а також завдяки генетичній селекції. Ключову роль у цьому успіху зіграли профілактичні заходи захворювання та вдосконалена практика лікування [71, 74].

На початковому етапі в 60-ті роки минулого століття був розроблений план боротьби з маститом із 5 пунктів. У зв'язку з цим широко впроваджена практика

дезінфекції дійок після доїння та загального застосування антибіотикотерапії пролонгованої дії. Загострилася увага щодо викликів, пов'язаних із патогенними мікроорганізмами навколишнього середовища. Управління доїнням, середовищем утримання та сухостійним періодом стало надзвичайно важливим. Для запобігання новим інтрамамарним інфекціям та збереження якості молока важливого значення набула підготовка вим'я перед доїнням. Також широко впроваджувалися методи вдосконалення та моніторингу стимуляції утилізації зараженого молока. Конструкція та функціонування доїльного обладнання, а також методи доїння для оптимізації чистоти, здоров'я дійок і подачі молока значно вдосконалилися.

Почали приділяти особливу увагу дизайну систем вільного стійлового утримання. Використання підрахунку КСК, як непрямого індикатора інтрамамарної інфекції, стало стандартним методом моніторингу якості молока. Європейське економічне співтовариство, а також інші країни, такі як Канада, розробили та впровадили штрафні програми КСК, щоб забезпечити значний економічний стимул для впровадження плану з 5 пунктів, щоб поставити під контроль цей показник на рівні стада [158].

План із п'яти пунктів виявився малоефективним проти патогенів навколишнього середовища. Тому в кінці минулого століття некомерційна професійна організація Національна рада з боротьби з маститом (NMC) розширила програму до десяти пунктів, які включали: встановлення цілі здоров'я молочної залози, забезпечення чистого та сухого утримання тварин, дотримання порядку утримання дійних корів у доїльній залі, правильно обрана процедура доїння, догляд за доїльним обладнанням, початок раннього та адекватного лікування клінічних випадків маститу, ведення обліку пролікованих корів з оцінкою та оновленням використовуваних антибіотиків, ефективне управління та вибіркове використання антибіотиків при лікуванні сухостійних корів, вибракування хронічно хворих невиліковних корів і періодична оцінка протимаститної програми [2, 267].

Подібні програми існують у багатьох країнах: Великобританії, Швеції, Канаді тощо. Завдяки їх реалізації за останні роки, особливо в країнах з більш розвиненою галуззю молочного скотарства, значно знизилася поширеність

контагіозного маститу, тоді як відносна захворюваність маститом навколишнього середовища зростає [71]. Можливою причиною такої зміни є постійне вдосконалення рівня гігієни та програм боротьби з маститом на фермах, тоді як ризик умов навколишньої території неможливо ефективно усунути.

Ситуація в країнах, що розвиваються, інша. Вибракування тварин, уражених маститом, переважно субклінічної форми, тут не практикується. Тому, патогени, виявлені у випадках субклінічного маститу, зазвичай походять від стійких або хронічних інфекцій. Звичайним джерелом інфекції є вим'я, уражене збудниками. Хвороба передається переважно через недотримання правил гігієни під час доїння та через те, що інфікованих корів не доять в останню чергу. Тому інфіковані корови, є основним джерелом маститу, а патогени, що походять із навколишнього середовища, мають другорядне значення [87, 180].

В останніх релізах NMC чітко встановлені не тільки основні 10 пунктів, але й підпункти програми. Наприклад у релізі від 2020 року у пункт 1. «Встановлення цілей щодо здоров'я вим'я» вказано ще 3 підпункти:

1.1. Встановіть реалістичні цілі щодо середньої КСК або лінійного показника та рівня клінічного маститу в середньому по стаду.

1.2. Своєчасно переглядайте цілі за участю консультативної групи зі здоров'я вим'я (ветеринар, виробник, менеджер стада, доярки та консультанти).

1.3. Визначайте пріоритетність управлінських змін для досягнення поставлених цілей (<https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2020/04/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM.pdf>).

Найвищі успіхи у вирішенні проблем з маститами досягнуто в країнах Європи, Канаді, США, Новій Зеландії та Австралії. Програми «п'яти» і «десяти» кроків, які з певними особливостями впроваджувались в цих країнах дозволили домогтись вагомих успіхів в боротьбі з цим захворюванням.

За повідомленнями Північної групи з виробництва та якості молока (NMSM) з 1993 по 2017 рік в цій боротьбі відбулися значні зміни. Результати ілюструють велику різницю між країнами, але також і значний прогрес. У всіх країнах відбулося значне зниження частоти лікування маститу: у Данії з 0,54 до 0,236, Фінляндії з 0,32 до 0,126, Норвегії з 0,51 до 0,144 і Швеції з 0,25 до 0,084. Кількість

соматичних клітин в об'ємному молоці також ілюструє зниження: в Данії з 370 до 204, Фінляндії 205 до 128, Норвегії 185 до 117, Ісландії з 378 до 204 в 1000 клітин/мл молока. При лікуванні сухостійних корів спостерігається дещо інша картина. Протягом останніх чотирьох років виявлено: у Данії, Норвегії та Фінляндії, відповідно, збільшення з 0,15 до 0,39; 0,02 до 0,04 та 0,08 до 0,12, а у Швеції та Ісландії зменшення з 0,3 до 0,27 та 0,17 до 0,15, відповідно [185].

У Сполучених Штатах максимальний обсяг КСК (1500000 клітин/мл) був вперше встановлений у 1967 році. Обмеження зменшувалося кілька разів. На сьогодні національні дані, зібрані для поголів'я США, продемонстрували значні покращення КСК в резервуарах, досягнувши середньозваженого значення молока 194 000 клітин/мл у 2015 році [94].

Дослідження на 52 молочних фермах в Англії та Уельсі проведене для визначення динаміки захворюваності корів на клінічний мастит при впровадженні чітко визначеного плану боротьби з маститом показало зниження на 22% частки хворих корів на інтервенційних фермах порівняно з контрольними. Також спостерігалось значне зниження, приблизно, на 20% у окремих корів КСК нижче 200 000 клітин/мл [113].

Незважаючи на величезні досягнення, у більшості регіонів мастит залишається найбільш економічно значущою бактеріальною хворобою молочної худоби. Постійний прогрес у боротьбі з маститом необхідний для забезпечення стабільності молочного скотарства в усьому світі. На жаль превентивні заходи не дають 100% результату, щодо запобігання захворювань молочної залози корів. Тому важливим пунктом програм залишається лікування хворих на мастит тварин.

У тваринництві для профілактики та лікування поширених патологій, в тому числі й маститу в основному використовуються антибіотики. Лікування ВРХ залежить від причини, клінічних проявів і чутливості збудника до антибіотиків. Є два варіанти їх застосування: інтрамаммарні антибіотики та системні антибіотики, що вводяться внутрішньом'язово або підшкірно.

Інтрамаммарні антибіотики повинні бути першою лінією лікування корів з легким неускладненим маститом в одній чверті. Системні антибіотики слід

використовувати, якщо уражено більше однієї чверті, коли помітні зміни вим'я або коли корова явно хвора. Комбінована терапія, як системними антибіотиками, так і тими, що вводяться інтрацистернально, може підвищити рівень бактеріологічного одужання, але її слід застосовувати досить обережно.

За оцінками 16% усіх молочних корів у Сполучених Штатах щорічно отримують антибіотикотерапію проти маститу. Крім того 80% молочних стад у США прийняли загальну терапію сухостійних корів для профілактики та лікування інтрамаммарних інфекцій (тобто введення інтрацистернально доз антибіотиків після кожної лактації кожній корові у всі чверті вим'я). Антибіотики, які використовуються для лікування, включають β -лактами (пеніцилін, цефалірин, цефтіофур, амоксицилін, гетацилін і клоксацилін), макроліди (еритроміцин), кумарини (новобіоцин) і лінкозаміди (пірліміцин) [130, 157, 174].

Відсутня альтернатива при лікуванні, яке має бути достатньо тривалим, щоб усунути субклінічний мастит, і достатньо коротким, щоб уникнути розвитку антибіотикорезистентності після отелення. Максимально мастити у корів проявляються у періоди лактації, коли молочна продуктивність досягає максимуму [140, 191, 240]. Тому сухостійний період – найкращий час для лікування маститу, оскільки протягом цього періоду не виробляється молоко. Ризик попадання антибіотиків у харчовий ланцюг зводиться до мінімуму, але слід дотримуватися обережності навіть після отелення [75].

На наш погляд, найбільш ефективними є заходи щодо лікування маститів у скандинавських країнах. Виробництво молока в них передбачає низьке споживання антибіотиків, тоді як здоров'я тварин, продуктивність та якість молока знаходяться на високому рівні. Виробники не мають доступу до ветеринарних препаратів без рецепта від ветеринара, тому більшість лікування ініціюють ветеринари, які також повинні реєструвати їх. Хоча реєстрація захворювань не є ідеальною, але досить точною. Крім того, погоджено схему кодування ветеринарних діагнозів. В результаті здоров'я тварин та виробництво молока добре контролюються. Продаж антибіотиків зазвичай відбувається лише через аптеки або безпосередньо від ветеринарів, яким заборонено отримувати прибуток від цих продажів. Використання критично важливих антибіотиків категорично не рекомендується в усьому регіоні. Ветеринарні та фермерські записи про продаж і

використання антибіотиків можуть випадково перевірятися органами влади на відповідність. Досить важливою є бактеріологічна діагностика. Щоб отримати інформацію, перед прийняттям рішення про лікування беруться проби молока та відправляються до лабораторії для мікробіологічного аналізу. Для швидкого підтвердження вибору препарату в гострих випадках клінічного маститу культивується відбір зразків молока з використанням чашок із селективним агаром. Також застосовується бактеріологічне спостереження після лікування [156, 261].

Тривалість лікування при застосуванні антибіотику коливається від 3 до 5 днів залежно від збудника. Наприклад, для *Staphylococcus aureus* і *Streptococcus uberis* рекомендується 5-денне лікування, але для незолотистого стафілококу вважається достатньою коротша терапія. Стосовно сухостійних корів використовується селективний метод, тобто лікування лише інфікованих тварин. Відбір корів, які є кандидатами на сухостійну терапію, здебільшого здійснюється на основі даних КСК від 1 до 3 записів молока, даних із системи автоматичних доїльних систем, історії маститу та результатів Каліфорнійського тесту [184, 200].

Не у всіх випадках клінічного маститу корисні антибіотики, оскільки 10-40% культур при клінічному маститі не мають бактеріального росту і не потребують антибіотикотерапії, а ще 40% позитивних культур (переважно грамнегативні бактерії та дріжджі) не чутливі до антибіотиків, дозволених для внутрішньомаммарного застосування. Інтрацистернальна антибіотикотерапія зазвичай рекомендована лише при інфекціях, спричинених грампозитивними бактеріями, такими як *S. aureus*, *S. agalactiae* та *Streptococci spp.* Навпаки, більшість грамнегативних інфекцій очищаються власною імунною системою корови. Таким чином, антибіотики, схвалені для використання інтрацистернально, ефективні лише при 20–50% випадків клінічного маститу [84].

Розумне застосування антимікробних препаратів при лікуванні маститу великої рогатої худоби широко визнано критично важливим аспектом управління молочними коровами, спрямованим на досягнення балансу між економічною життєздатністю, благополуччям тварин і здоров'ям вим'я. Але поява стійких до протимікробних препаратів штамів стає однією з найсерйозніших проблем для глобальної охорони здоров'я, продовольчої безпеки та соціального розвитку [148, 263]. Неправильне та/або надмірне використання антибіотиків сприяє появі

резистентних патогенів. Виявлено багато збудників маститу в різних країнах, які є стійкими до звичайних антибіотиків (рис.1.4).

Назва бактерій	Антимікробні препарати																							Джерело	
	P	AP	OX	AM	AC	CX	CR	CT	CE	CC	NE	G	KN	AI	CL	F	ER	TE	EN	CI	CO	VA	LN		M
Staphylococcus aureus	100	100						100	100			33					44	83						67	Guanajuato, Mexico
	50				28			39	39			22	28		28		17	17		11		11		32	Canadian Bovine Mastitis Network
	32		100						100								56	56				72	60		
	90		73												40		NM	NM				NM	80	95	India
	93	87	47														70							100	
Staphylococcus agalactiae	46	44	31									100			100		18	26		100				31	Malaysia
	86	86	100			100	98			98	90	100					90		98						Rondonia, Brazil
	5	5	5				100	100			16	3			100	1		21	100					1	Minas Gerais, Brazil
	59				47			53	53	100					35		54	29		83		12		47	Canadian Bovine Mastitis Network
	50				28			33	39	100					28		28	11		82		22		37	
Staphylococcus uberis	16		4				3	1									9	86	9					25	Lombardy, Italy
Nocardia	100	100	100	100	NM	100						100	100			100	100	100		100				100	Pernambuco, Brazil
Escherichia coli		90		95					33		26	37	32	37				90		5	NM			82	Bangladesh
		58		75	23			52				12	32		6			52	39		13			93	Algeria
		83										67	50							75				100	China
		76		NM				86				NM		NM	33			NM		NM				85	
Pseudomonas aeruginosa								60				55		60						45	85			35	India
Klebsiella pneumoniae		93		79				NM				NM		NM	36			NM		36				50	
CPS	33	22	89			89	89			89	77	89					89		89					NM	Rondonia, Brazil
CNS	69	69	96			96	96			92	89	100					96		96					NM	

Рис.1.4. Стійкі до антибіотиків штами бактерій, що викликають мастит [160] :

P Пеніцилін, **AP** Ампіцилін, **OX** Оксацилін, **AM** Амоксицилін, **AC** Амоксицилін/клавуланова кислота, **CX** Цефалексин, **CR** Цефтіофур, **CT** Цефотаксим, **CE** Цефтазидим, **CC** Кліндаміцин, **NE** Неоміцин, **G** Гентаміцин, **KN** Канаміцин, **AI** Амікацин, **CL** Хлорамфенікол, **F** Флорфенікол, **ER** Еритроміцин, **TE** Тетрациклін, **EN** Енрофлоксацин, **CI** Ципрофлоксацин, **CO** Колістин, **VA** Ванкоміцин, **LN** Лінезолід, **M** Мультирезистентність, **NM** Результати не вказані, **CPS** Коагулазопозитивний стафілокок, **CNS** Коагулазонегативний *Staphylococcus spp.* Червоний колірний блок - резистентний, зелений колірний блок - чутливий, синій колірний блок - мастит, білий колірний блок - не виявлено, цифри на червоному та зеленому колірних блоках представляють відсоток резистентних та чутливих штамів, відповідно.

Виклики, пов'язані зі стійкістю до антибіотиків, необхідність скорочення їх використання в молочній промисловості та зменшення фінансових втрат, вимагають розробки нових методологій лікування маститу. Зараз використовується багато сучасних методик і препаратів, в тому числі: терапія нестероїдними протизапальними препаратами [184, 204, 245], застосування фітопрепаратів [164, 264], бактеріоцинів [258], пептидоглікангідролази [205], антимікробних пептидів [134] і бактеріофагів [84, 139, 146].

Існує ряд альтернативних методів лікування, які застосовуються в обмеженому обсязі. Серед них такі нетрадиційні методи лікування, такі як субстанції на рослинній основі [121, 149], пребіотики [171], стовбурові клітини [110, 195], холодна лазерна терапія [223], акустична пульсотерапія [159] тощо.

1.5. Перспективність використання ліпосомальних препаратів

Ліпосомальні добавки – це система транспортування поживних речовин, яка доставляє активні молекули безпосередньо туди, де вони найбільше потрібні, що дозволяє використовувати їх з максимальною ефективністю. Багато важливих для нормальної життєдіяльності та лікування речовини, такі як вітамін С, вітамін D, магній, глутатіон та багато інших, є кандидатами на ліпосомну доставку, яка заважає шлунковій кислоті розщеплювати їх та знижувати ефективність. Використання ліпосомальної доставки забезпечує доступність активних молекул в оптимальних для їх функціонування місцях, включаючи вим'я. Логічно, що препарати на основі ліпосом все частіше застосовуються при лікуванні різних захворювань ВРХ, в тому числі й маститу корів в Україні [5, 18, 34, 36, 51, 53, 85] та світі [163, 201, 239].

Розмір ліпосом може варіювати від маленьких (0,025 мкм) до великих (2,5 мкм) везикул. Також вони можуть мати одну або двошарову мембрану. Розмір везикул є важливим параметром у визначенні періоду напіврозпаду ліпосом. Його величина і кількість подвійних шарів впливають на ступінь інкапсуляції ліків у ліпосомах. Двошарові везикули на основі ліпідів можуть інкапсулювати, доставляти та вивільняти малорозчинні ліки та малі молекули до певного цільового місця в організмі, що значно покращує доставку вакцин, фармацевтичних і біологічних препаратів. Завдяки своїй двошаровій везикулярній структурі схожій з природними клітинами, ліпосоми здатні включати ліки як у водне ядро, так і в ліпідні подвійні шари (рис.1.5). Така фармакокінетика лікарського засобу може контролюватися та диктуватися ліпосомальною системою доставки, а не властивостями препарату, що дозволяє розробити лінію клінічно схвалених лікарських засобів на основі ліпосом [70, 96, 128, 256].

В залежності від ліпідного складу, поверхневого заряду, розміру та способу отримання властивості ліпосом значно різняться (табл.1.2).

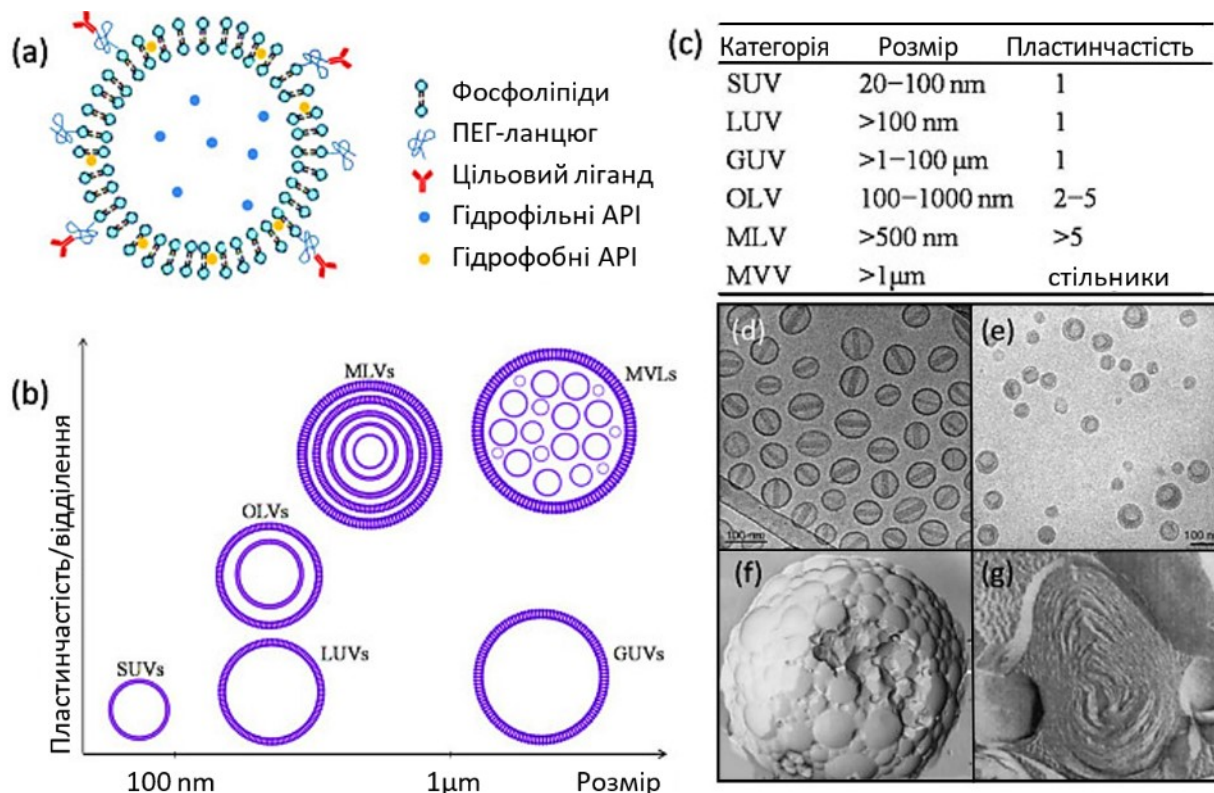


Рис.1.5. Категорії та структури ліпосомальної системи доставки ліків [162]:

(a) – структурна ілюстрація складу ліпосом (розмір типового фосфоліпідного подвійного шару становить 4,5 нм, що набагато менше, ніж у внутрішнього водного ядра); (b) – класифікація ліпосомальних везикул відповідно до їх пластинчастості/компарменту та розміру частинок; (c) – розмір і пластинчастість різних типів ліпосом; (d, e) – криотрансмісійна електронна мікроскопія; (f, g) – електронні мікрофотографії частинок DeroFoam™ із типовим діаметром 1–100 мкм і MLVs із типовим діаметром 0,2–5 мкм.

Оскільки організм розпізнає ліпосоми, він не створює імунної відповіді, а натомість приймає їх у клітини, де вони можуть бути використані. Метою створення ліпосомальних добавок є використання їх як кращих систем доставки поживних речовин і ліків, що транспортують активні молекули до потрібного пункту призначення [21, 33, 162].

Досягнення в розробці ліпосом ведуть до нових можливостей, щодо їх застосування для доставки нових біотехнологічних продуктів, наприклад, антисенсових олігонуклеотидів, клонованих генів і рекомбінантних білків. В літературних джерелах є велика кількість інформації, яка визначає життєздатність широкого спектру консервативних лікарських засобів у ліпосомах, що часто

призводить до покращення терапевтичної активності та/або зниження токсичності порівняно зі стандартними лікарськими засобами [59].

Таблиця 1.2

Переваги та недоліки ліпосом [162]

Переваги ліпосом	Недоліки ліпосом
Підвищення ефективності та терапевтичного індексу препаратів	Низька розчинність
Підвищена стабільність ліпосом завдяки інкапсуляції	Короткий період напіввиведення
Ліпосоми є нетоксичними, гнучкими, біосумісними, повністю біорозкладними та неімуногенними для системного та несистемного введення	Іноді фосфоліпід піддається реакції окислення і гідролізу
Ліпосоми знижують токсичність інкапсульованого агента	Витік і злиття інкапсульованого препарату/молекул
Допомагають зменшити вплив токсичних препаратів на чутливі тканини	Висока собівартість
Ефект уникнення сайту та гнучкість у поєднанні з сайт-специфічними лігандами для досягнення активного націлювання	Менша стабільність

Ліпосоми внесли важливу альтернативу в доставку ліпідів. Препарат, завантажений у ліпосому, захищений від фізіологічних впливів, таких як ферментативна деградація, хімічна та імунологічна інактивація та швидке очищення плазми, що сприяє покращенню та подовженню його дії. Оскільки препарат знаходиться всередині ліпосоми, відбувається мінімізація його впливу на здорову тканину, зменшення небажаних побічних ефектів порівняно з його вільною формою. Встановлено, що ліпосоми позбавлені антигенних властивостей. Отже, їхній «вантаж» надійно прихований від контакту з імунною системою, що не викликає антигенну стимуляцію [21].

Завантаження лікарського засобу може бути досягнуто або пасивно (тобто лікарський засіб інкапсулюється під час утворення ліпосом), або активно (тобто після утворення ліпосом). Гідрофобні лікарські засоби, наприклад амфотерицин

В, таксол або анаміцин, можуть бути безпосередньо об'єднані в ліпосоми під час утворення везикул, і кількість поглинання та утримання регулюється взаємодією між ліками та ліпідами. Досить часто досягається максимальна ефективність захоплення, але результат залежить від розчинності препарату в мембрані ліпосоми. Пасивна інкапсуляція водорозчинних лікарських засобів залежить від здатності ліпосом уловлювати водний буфер, що містить розчинену лікарську речовину під час утворення везикул [59, 116, 216].

1.6. Ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату

Етилтіосульфанілат – це синтетична сульфуроорганічна сполука, яка належить до класу тіосульфонатів. Вони виготовлені з природних біологічно активних речовин, які містяться в часнику, цибулі, цвітній капусті та броколі. Синтетичні тіосульфонати більш стабільні, ніж натуральні аналоги, мають ширший спектр біологічних властивостей і досить низьку токсичність [169].

Естери тіосульфокислот демонструють широкий спектр біологічної активності. Вони ефективні проти різних мікроорганізмів, зокрема бактерій та грибів і характеризуються протизапальною, антиоксидантною та цитотоксичною активністю [65, 83, 167, 181, 183, 226, 230]. Завдяки цим властивостям синтезовані естери тіосульфокислот розглядаються як перспективні речовини для розробки ефективних терапевтичних засобів. Важливою особливістю сполук тіосульфонатної структури є їх здатність знижувати рівень ліпідів у крові [154]. Дослідження біологічної дії ЕТС показали широкий спектр антимікробної активності. Він активний не тільки по відношенню до мікроміцетів, дріжджових культур, але і до грампозитивних і грамнегативних бактерій, включаючи патогенні, умовно-патогенні та фітопатогенні мікроорганізми [165].

Лікування маститу через появу та збільшення чисельності збудників, стійких до антибіотиків, стає дедалі складнішим і залишається однією з головних проблем молочної галузі, яка вимагає пошук нових ефективних терапевтичних засобів з широким спектром, ефективністю та швидкістю дії, щоб забезпечити оперативне лікування поголів'я.

Природні сульфонати і тіосульфонати, отримані з рослин роду *Allium*, можуть

служувати як замітники антибіотиків. Серед них пропілпропан тіосульфонат (PTSO) виявилися найбільш перспективним для практичного використання (рис.1.6).

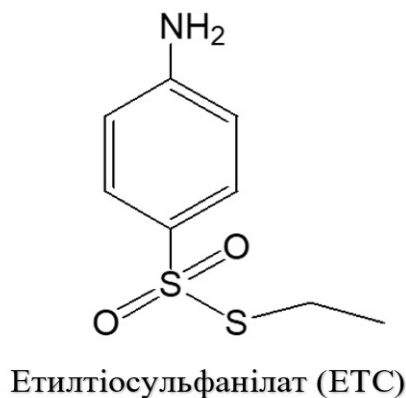
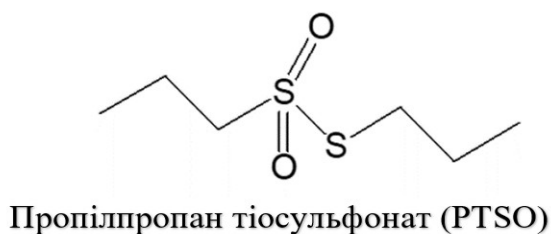


Рис. 1.6. Формули тіосульфонатних субстанцій

PTSO має мінімальні небажані ефекти, такі як поява нетипового запаху в молоці, фактор, який набуває значення в контексті використання сполук, виділених з часнику або цибулі. [54]. Він проявляє протимікробні, антиоксидантні, метаболічні, пробіотичні, протизапальні та протипухлинні властивості [268]. Однак, це летка сполука, що ускладнює її широке практичне застосування. Проведено пошук не менш дієвої але більш зручної у використанні субстанції серед синтетичних тіосульфонатів, які теж є малотоксичними та мають широкий спектр біологічної дії. Як реагент для органічних перетворень тіосульфонати особливо цікаві з огляду на їх здатність реагувати з нуклеофілами, електрофілами та радикалами [172].

Аналіз літературних даних, щодо антибактеріальної, протигрибкової, антиоксидантної, антивірусної, антитромботичної, протипаразитарної дії та безпечності синтетичних тіосульфонатів дозволяє запропонувати етилтіосульфанілат як перспективну субстанцію для лікування маститу [119, 166, 183].

На кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» на основі солей тіосульфокислот синтезовано етилтіосульфанілат (ЕТС, S-етил 4-амінобензолсульфонотіоат, S-етиловий ефір 4-амінобензолтіосульфокислоти) як структурний аналог ряду фітонцидів [168, 268].

1.7. Висновки з огляду літератури

Численні літературні джерела свідчать про те, що мастит корів є причиною значних економічних збитків у молочній сфері. Зустрічаються різні оцінки збитковості. Зокрема, мастит, переважно спричинений бактеріальною інфекцією молочної залози, є основною проблемою акушерської патології молочних корів, яка, за оцінками, коштує світовій молочній промисловості 16 – 26 мільярдів євро на рік, виходячи з того, що світове поголів'я молочних корів становить 271 мільйон голів [187].

Виконаний аналіз показав досить гетерогенну картину щодо етіології маститу корів. Більше однієї третини всіх молочних корів мають стафілококову інфекцію. *Staphylococcus aureus* є найбільш часто виділеним патогеном, за ним йдуть *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* та *Escherichia coli* [108, 227, 241].

Вагому роль в розвитку патологічного процесу при маститі корів відіграють механізми імунного захисту природнього та адаптивного імунітету, системи антиоксидантного захисту [10, 77, 93, 118, 193].

Антибіотикотерапія, як основний напрямок лікування маститів, з появою мультирезистентних штамів і можливістю поширення стійких форм на патогени, що вражають людей, викликають необхідність, як удосконалення традиційних варіантів лікування, так і розробку нових нетрадиційних підходів для вирішення даної проблеми [60, 84, 134, 203].

В науковій літературі практично відсутні відомості про вплив ліпосомальних препаратів на основі етилтіосульфанілату на зміну біохімічного

профілю крові, компоненти якого приймають активну участь у нейтралізації токсичної дії патогенів захворювання, на активність гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму і клітинний та гуморальний механізм імунної відповіді.

На сьогодні доведено генетичну обумовленість патологічних процесів при запаленні молочної залози. До генів-кандидатів асоційованих з захворюванням належать алелі гена BoLA-DRB3. В науковій літературі дослідженням зв'язку між алелями гена BoLA-DRB3 і соматичними клітинами молока, як фенотиповим показником здоров'я молочної залози, присвячено мало уваги.

Наше дослідження спрямоване на вирішення означених проблем, пов'язаних з маститами. На основі показників, отриманих в експериментальній частині роботи, проведено аналіз виявлених результатів, представлено висновки та пропозиції щодо подальшого використання ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату для лікування клінічної та субклінічної форм маститів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Схема проведення досліджень

Дисертаційна робота виконувалась впродовж 2020–2023 р.р. на кафедрі гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет», в лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН та в лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН.

Виробничі дослідження проведено у фермерському господарстві «Подільська марка» Кам'янець-Подільського району та ТОВ НВА «Перлина Поділля» Шепетівського району Хмельницької області. Об'єктом дослідження були корови Української чорно-рябої молочної та голштинської порід.

За схемою досліджень передбачались наступні етапи виконання поставлених завдань (рис.2.1).

На першому клініко-діагностичному етапі вивчали поширення, форми та перебіг маститу корів у Хмельницькому регіоні та в дослідних господарствах і бактеріальну етіологію клінічного та субклінічного маститу корів. Бактеріологічні дослідження проведено у Хмельницькій регіонарній державній лабораторії та у Кам'янець-Подільській районній лабораторії Держпродспоживслужби.

Для бактеріологічного аналізу та ідентифікації основних бактеріальних збудників катарального маститу біологічний матеріал (секрет з хворої чверті вим'я) було відібрано в асептичних умовах у стерильні пляшки із гвинтовою кришкою. При субклінічному перебігу захворювання у стерильні пляшки із гвинтовою кришкою відбирали альвеолярне молоко наприкінці доїння. При бактеріологічному дослідженні використовували поживні середовища: жовтково-сольовий агар та BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Індія) для культивування стафілококів; агар Едвардса (Biolife Italiana S.r.l.) і 5% кров'яно-сольовий агар – для стрептококів; середовища Ендо, Левіна (Фармактив) – для

ентеробактерій та *Pseudomonas Isolation Agar* (HiMedia) для ідентифікації синьогнійної палички.

Культивування мікроорганізмів проводилося при температурі 37°C, а отримані дані підлягали оцінці через 1 – 2 доби. Ідентифікація чистих культур була полегшена завдяки застосуванню різноманітних аналітичних методів, що охоплюють морфологічні, тинкторіальні, культуральні та біохімічні властивості.

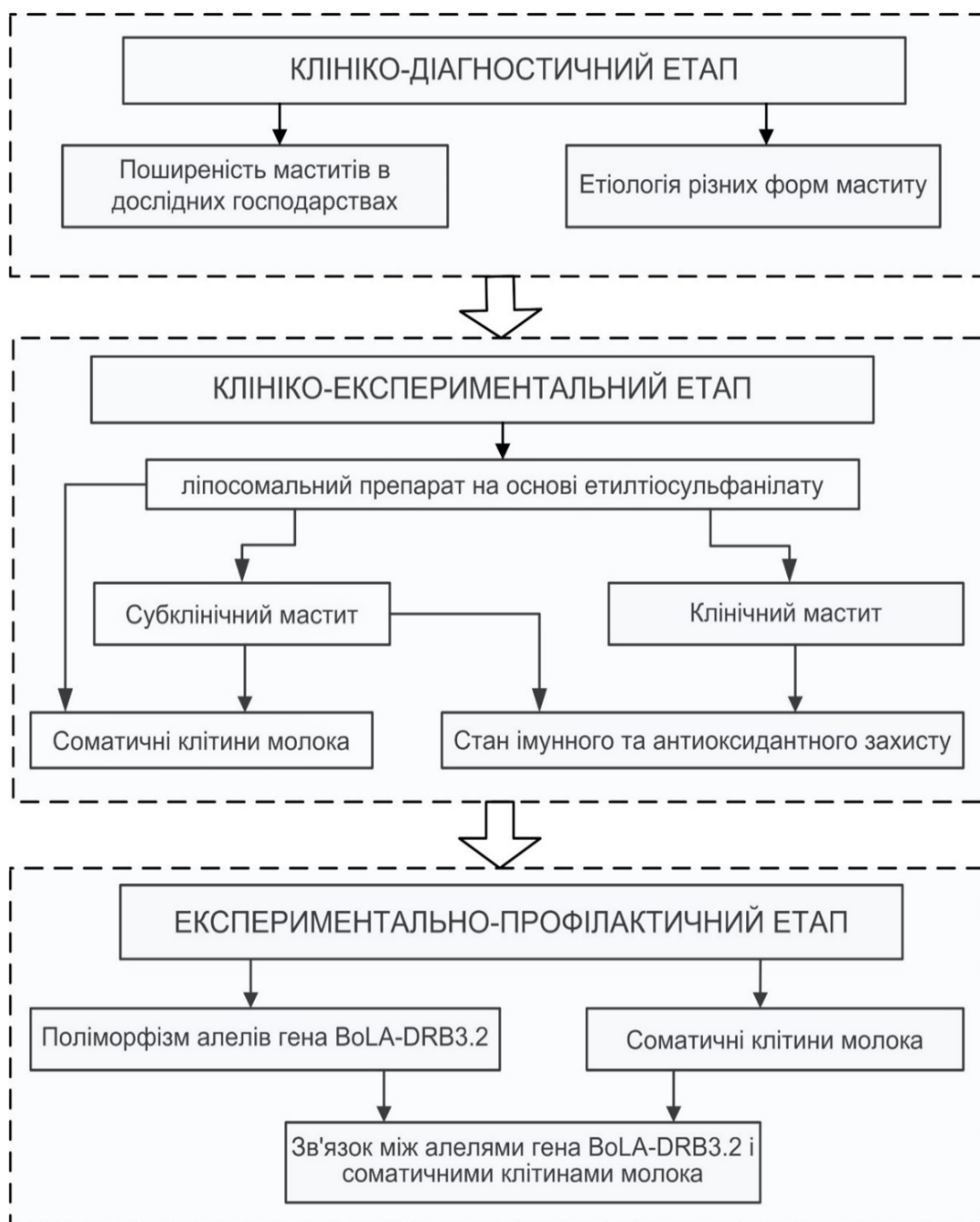


Рис.2.1. Схема дослідження

Ідентифікація підтверджувалася за допомогою визначника за Берджі.

Антибактеріальну чутливість ізолятів визначали за допомогою методу дискової дифузії *in vitro* з використанням стандартних комерційних дисків [4].

Антимікробну активність етилтіосульфанілату досліджено за допомогою методу дифузії в агар (метод «колодязів») в умовах *in vitro* по відношенню до 5 музейних штамів тест-мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (F-49), *Staphylococcus epidermidis* 191, *Klebsiella pneumoniae* 43, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATC 27853 (F-51). Для приготування початкового розчину використовували димексид з концентрацією 0,1 г/мл досліджуваної сполуки, враховуючи, що в фізіологічному розчині утворюється осад. Подальші розведення виконували фізіологічним розчином, а досліджувану речовину наносили на стерильні диски по 0,02 мл. Стандарти дослідження забезпечували товщиною середовища в чашці Петрі з діаметром «колодязя» 6 мм. Для посіву використовували суспензію добової культури тест-мікроорганізму з мікробним навантаженням 0,5 за Mc-Farland, яке визначали за допомогою денситометру DENSIMAT. Після посіву суспензії тест-штаму на тверде поживне середовище «колодязі» заповнювали розчинами досліджуваної субстанції. Чашки Петрі поміщали в термостат за температури 37°C на 24 год. Після чого проводили облік результатів за наявністю зон затримки росту тест-штамів, які чітко було видно навколо «колодязів», шляхом вимірювання діаметра цих зон у міліметрах. Музейні штами, залежно від діаметрів зон затримки росту дослідних мікроорганізмів навколо лунки, відносили: до чутливих (якщо діаметр перевищував 25 мм), помірно стійких (15–25 мм) або малочутливих (8–14 мм) та резистентних.

Другий етап клініко-експериментального дослідження полягав у виконанні двох виробничих дослідів на тваринах.

Дослід 1. Метою експерименту було з'ясувати вплив ліпосомального препарату на основі ЕТС на клітинний та гуморальний імунітет, а також активність механізмів антиоксидантного захисту у корів, уражених катаральним маститом. Для дослідження ефективності препарату були сформовані 2 групи корів 2 – 3 лактації: контрольна і дослідна, по 7 тварин у кожній. До контрольної

групу увійшли тварини, які вважалися клінічно здоровими, тоді як дослідна група була сформована з корів, відібраних випадковим чином з діагнозом катаральний мастит (табл.2.1).

Таблиця 2.1

Виробничий дослід №1

ФГ «Подільська марка» Кам'янець-Подільського району Хмельницької області	
КОНТРОЛЬНА ГРУПА ($n = 7$) клінічно здорові тварини, КСК у молоці до 200 тис. кл./см ³	ДОСЛІДНА ГРУПА ($n = 7$) тварини із катаральною формою маститу, кількість соматичних клітин у молоці понад 500 тис. кл./см ³
	ліпосомальний препарат на основі ЕТС (з вмістом 1,25%) і дозою 0,04 мл/кг маси тіла тварини (внутрішньом'язове введення тричі з інтервалом у 24 год.)
Забір крові з яремної вени: - перший день експерименту для групи клінічно здорових тварини; - перший день експерименту (перед введенням препарату) на 3-тю і 7-му добу для дослідної групи корів з катаральною формою маститу.	

Коровам дослідної групи було зроблено три ін'єкції внутрішньом'язово з інтервалом 24 години. Для ін'єкцій використовували ліпосомальний препарат на основі ЕТС з параметрами концентрації та дози, зазначеними в табл. 2.1. Хворим тваринам змінили раціон годівлі – провели обмеження випоювання води, обмежили концентровані корма, в раціон включили сіно з злаково-бобових трав.

Також, корови були переведені на ручне доїння, тваринам проводили масаж вим'я зверху донизу. За 5- 10 хвилин до доїння вводили 50 ОД дії окситоцину в/м. Клінічне дослідження молочної залози корів проводили за схемою, що включає огляд, пальпацію вим'я, звертаючи увагу на розмір, консистенцію та симетричність чвертей вим'я, болючість, місцеву температуру. Під час пробного здоювання враховували кількість і характер видоєного секрету. Наявність запалення в молочній залозі встановлювали на підставі

наявності хворобливості, підвищення місцевої температури, змін консистенції і кольору секрету вим'я, а також позитивних реакцій експрес-тесту на вміст соматичних клітин у сирому молоці, та проби відстоювання в ньому.

Для біохімічних та імунологічних досліджень проводили забір крові у корів за добу до введення, а також на третю та сьому добу після застосування препарату.

Дослід 2. Метою даного дослідження було з'ясувати вплив комплексного ліпосомального препарату на базі ЕТС на метаболічний гомеостаз корів з субклінічною формою маститу.

Виробничі дослідження виконані на дійних коровах 2 і 3 лактації, які були розділені на контрольну (здорові тварини) та дослідну групи (з ознаками субклінічного маститу) по 5 тварин у кожній, проводили в ТОВ НВА «Перлина Поділля» Шепетівського району Хмельницької області.

Діагностика субклінічного маститу у корів зазвичай проводилася за допомогою методу Kenotest CID LINES N. V., який застосовується відразу після доїння. Процедура Kenotest заснована на методі СМТ (Каліфорнійський тест на мастит) з використанням спеціальної тестової пластини. Точність діагностики підтверджувалася бактеріологічним аналізом. Кількість соматичних клітин у зразках молока визначали за допомогою аналізатора LACTOSCAN SCC COMPACT. Для бактеріологічного дослідження відбирали зразки молока з КСК ≥ 800 тис. кл./см³. Патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми були виділені та ідентифіковані із проб молока відповідно до встановлених методів та стандартів [27, 31].

Коровам дослідної групи з діагнозом субклінічний мастит тричі з інтервалом в 24 години вводили внутрішньом'язево ліпосомальний препарат з вмістом ЕТС і дозою наведеними в табл. 2.2.

Комплексний ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату – це суміш антимікробних речовин та інших інгредієнтів з наступними пропорціями компонентів: на 10 см³ препарату: ЕТС 90 – 110 мг, вітаміни: А 160 – 170 Од, D₃ 220 – 230 Од і Е 0,2 – 0,4 мг; лецитин 20 – 30 мг, твін 0,04 – 0,06 см³; вода для ін'єкцій до 10 см³. Суміш ретельно перемішували з наступним диспергуванням

протягом 2 – 3 хвилин на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-1 до утворення тонкої дисперсійної емульсії.

Таблиця 2.2

Виробничий дослід №2

ТОВ НВА «Перлина Поділля» Шепетівського району Хмельницької області	
КОНТРОЛЬНА ГРУПА ($n = 5$) клінічно здорові тварини, КСК у молоці до 200 тис. кл./см ³	ДОСЛІДНА ГРУПА ($n = 5$) тварини із субклінічним маститом, кількість соматичних клітин у молоці понад 500 тис. кл./см ³
	ліпосомальний препарат на основі ЕТС (з вмістом 1,25%) і дозою 0,04 мл/кг маси тіла тварини (внутрішньом'язове введення тричі з інтервалом у 24 год.)
Забір крові з яремної вени: - перший день експерименту для групи клінічно здорових тварини; - перший день експерименту (перед введенням препарату) на 3-тю і 7-му добу для дослідної групи корів з катаральною формою маститу.	

2.2. Методи досліджень морфологічних показників крові

Матеріалом для досліджень слугували зразки крові тварин, отримані за добу до введення та на третю і сьому добу після введення препарату. Гематологічні параметри крові досліджували за загальноновживаними методами, описаними в довіднику Влізло та інш. [4].

Кількість еритроцитів і лейкоцитів підраховували у сітці лічильної камери Горяєва. Для підрахунку еритроцитів у пробірку вносили 3,98 мл 0,85% розчину NaCl і 0,02 мл крові. Кров, розведену в пропорції 1 до 200, добавляли на дно пробірки ретельно перемішуючи з фізіологічним розчином. Відбирали 1 – 2 краплі розведеної крові та заповнювали ними камеру. Через 1 хв після заповнення камери при малому збільшенні мікроскопа підраховували еритроцити. кількість яких визначали за формулою:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 200}{80},$$

де: X – кількість еритроцитів у 1 мкл крові;

a – кількість еритроцитів у 80 малих квадратах;

80 – кількість малих квадратів;

200 – коефіцієнт, який враховує розведення крові;

4000 – коефіцієнт приведення 1 мкл крові до об'єму малого квадрата.

Визначення кількості лейкоцитів. У пробірку вносили 0,4 мл розчину Тюрка та 0,02 мл крові. Підрахунок починали через 1 хв після заповнення камери. Використовували мале збільшення мікроскопу при затемненому полі зору. Підрахунки лейкоцитів проводилися в 100 великих квадратах і визначали їх чисельність за формулою:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 20}{1600},$$

де: X – кількість лейкоцитів у 1 мкл крові;

a – кількість лейкоцитів у 100 великих квадратах;

20 – коефіцієнт розведення;

4000 – коефіцієнт приведення 1 мкл крові до об'єму малого квадрата;

1600 – кількість малих квадратів.

Аналіз лейкограми проводився за загальноприйнятою методикою, яка передбачала використання мазків крові, забарвлених за Романовським-Гімзою, під імерсійною системою мікроскопа. Цей метод передбачав диференційний підрахунок 100 лейкоцитів.

Концентрацію гемоглобіну визначали гемігلوبінціанідним методом. У пробірку додавали 5 мл трансформуючого розчину і долучали 20 мкл крові. Розчин старанно перемішували та залишали при кімнатній температурі на 30 хв. Оптичну густину отриманого розчину гемігلوبінціаніду визначали на спектрофотометрі при 540 нм проти трансформуючого розчину.

Концентрацію гемоглобіну (г/л) визначали за формулою:

$$H_b = E_{540} \times 64,458 \times 251/44 = E_{540} \times 367,7,$$

де: E_{540} – оптична густина дослідного взірця;

64,458 – мілімолярна маса гемоглобіну (гр.);

251 – показник розведення крові;

44 – мілімолярний коефіцієнт екстинкція.

Загальний протеїн визначали за біуретовою реакцією [4].

2.3. Методи досліджень імунологічних показників крові

Активність гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму визначали за вмістом циркулюючих імунних комплексів, бактерицидною та лізоцимною активністю сироватки крові.

Визначення активності лізоциму. Для визначення активності лізоциму використовували нефелометричний метод [9]. Для цього на добовій культурі *Micrococcus lysodeikticus* вирощений на скошеному агарі, готували мікробну завись на фосфатному буфері (рН 7,2 – 7,4). Завись стандартизували на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром в кюветах з робочою довжиною 3 мм. Змішували 1,47 мл мікробного змиву культури *Micrococcus lysodeikticus* і 0,03 мл сироватки крові, струшували пробірку та поміщали її в термостат при 37°C на 1 годину. Ще раз струшували суміш, проводили нефелометрію і реєстрували показники. Активність лізоциму визначали як різницю між числовими даними часток світлопроникнення вихідної мікробної зависі (20%) і досліджуваної зависі.

Визначення бактерицидної активності сироватки крові [4]. Бактерицидну активність визначали фотонейфелометричним методом з тестовою культурою *E. coli*, штаму ВКМ-125. На фізіологічному розчині готували змив із добової культури ешерихії, визначали її щільність на фотоелектроколориметрі. У пробірки добавляли по 4,5 мл стерильного м'ясо-пептонного бульйону, а в дослідну – додавали 1 мл досліджуваної сироватки, а в контрольну – 1 мл фізіологічного розчину. Потім добавляли по одній краплі 24 годинної культури кишкової палички. Вміст пробірок перемішували і піпеткою відбирали по 2 мл для визначення оптичної густини. Надлишок суміші в пробірках інкубували в термостаті при температурі 37°C протягом 3 год, після чого вимірювали та визначали оптичну густину вмісту обох пробірок:

$$\text{БАСК} = \frac{D_0 \text{ через 3 год.} - D_0 \text{ перед інкубацією}}{D \text{ через 3 год.} - D \text{ перед інкубацією}} \times 100$$

де: D_0 – початкова оптична густина;

D – кінцева оптична густина.

Визначення циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові. В пробірку вносили 0,3 мл боратного буферу і 0,15 мл досліджуваної сироватки крові. Далі вміст пробірки ретельно мішали і заносили 0,22 мл у другу пробірку з додаванням 2 мл поліетиленгліколю, ретельно змішували, інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі і фотометрували. Визначали різницю показників оптичної густини і результат множили на 1000 для отримання вмісту ЦІК у 100 мл сироватки крові.

Визначення кількості Т- і В-лімфоцитів. Визначення загальної кількості Т-лімфоцитів проводили на основі методу спонтанного розеткоутворення, в якому в якості маркерів використовували еритроцити барана [141, 260]. Тест базується на здатності ЕБ у значній кількості утворювати спонтанні розетки з лімфоцитами. Підрахунок розеток проводять у висушених мазках зафарбованих за Романовським-Гімзою. До Т-розеткоутворюючих лімфоцитів відносять клітини, які приєднали до себе не менше трьох ЕБ.

Дослідження проводили в такій послідовності. Спочатку готували градієнт густини фікол-верографіну, для чого 9,5 г фіколу відважували у мірний циліндр, розбавляли його теплою дистильованою водою об'ємом 100 см³ і додавали 20 см³ 76% розчину верографіну. Дистильованою водою при допомозі ареометра доводили відносну густину до значення 1,077. ЕБ одержували з дефібринованої крові центрифугуванням при 1200 хв⁻¹ протягом 10 хв, попередньо відмиваючи їх по 2–3 рази фізіологічним розчином до світлого надосаду. Отриманий осад еритроцитів був основою для приготування 0,5% зависі.

Визначення загальної кількості Т-лімфоцитів (ТЕ-ПУЛ.) У пробірку вносили 0,1 см³ суспензії лімфоцитів і додавали 0,1 см³ 0,5% зависі ЕБ, суміш інкубували в термостаті протягом 7 хв при температурі 37°C. Отриману суміш центрифугували при 1000 хв⁻¹ протягом 5 хв і ставили у холодильник при температурі 4°C на 1 год. Далі проводили фіксацію 0,1 см³ суміші 0,3%

розчином глютарового альдегіду протягом 20 хв, зупиняли реакцію додаванням $0,4 \text{ см}^3$ дистильованої води, центрифугували 3 хв при 1000 хв^{-1} , відбирали надосад, а осад ресуспендували і робили мазок на предметному склі. Мікроскопію мазків проводили під імерсією при збільшенні $90\times$.

Визначення кількості активних Т-лімфоцитів (ТА-ПУЛ.) На основі принципу спонтанної інкорпорації гетерогенних еритроцитів до поверхні лімфоцитів їх активні субпопуляції дозволяють виявити високоавідні рецептори до ЕБ, які активно з'єднуються з ними без зайвої інкубації. Аналогічно попередньому методу, у пробірки вносили $0,1 \text{ см}^3$ суспензії лімфоцитів, додавали $0,1 \text{ см}^3$ 0,1% зависі ЕБ, центрифугували протягом 5 хв при 1000 хв^{-1} , надосад відбирали, а осад ресуспендували і робили мазок на предметному склі.

Визначення Т-хелперів (Th-ПУЛ, $CD4^+$ Т-лімфоцитів). Методика ґрунтується на тому, що Т-хелперні клітини несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу М, а Т-супресори – до імуноглобулінів G. Хелперними вважають лімфоцити, які здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном [7].

Для досліду готували 0,09 % розчин теофіліну на забуференому фізіологічному розчині. Далі у пробірки вносили $0,1 \text{ см}^3$ суспензії лімфоцитів, додавали $0,1 \text{ см}^3$ 0,09% розчину теофіліну з наступною інкубацією протягом 30 хв при температурі 37°C . Забуферений фізіологічний розчин відмивали двічі. Відбирали надосад, а осад ресуспендували, додавали $0,1 \text{ см}^3$ 0,5% зависі ЕБ, інкубували 7 хв при температурі 37°C та центрифугували 5 хв при 1000 хв^{-1} . Пробірки залишали у холодильнику при температурі 4°C на 60 хвилин, після чого фіксували протягом 10 хв 0,3% розчином глютарового альдегіду об'ємом $0,1 \text{ см}^3$. Для фіксації і зупинки реакції додавали $0,4 \text{ см}^3$ дистильованої води. Після центрифугування протягом 5 хв при 1000 хв^{-1} , відбирали надосад, осад ресуспендували і робили мазок на предметному склі. Мазок фіксували метанолом протягом 3 хв, висушували його на повітрі, після чого фарбували за Романовським-Гімзою. Змивали мазок дистильованою водою, висушували та проводили підрахунок кількості розеткоутворюючих клітин під мікроскопом. Барвник для фарбування складався з 3 см^3 концентрованої фарби Романовського і 17 см^3 дистильованої води.

За Т-розеткоутворюючі лімфоцити вважали клітини, які адсорбували до себе не менше трьох еритроцитів барана. При цьому розрізняли їх за кількістю приєднаних еритроцитів: нульові Т-лімфоцити – які не адсорбували ЕБ, малодиференційовані – які приєднали від 3 до 5 еритроцитів, середньої авідності, які приєднали від 6 до 10 та високодиференційовані – більше 10 (*М* – морула) еритроцитів барана [7].

Кількість теофілінчутливих лімфоцитів-супресорів. Ts-супресори визначали як різницю віднімання числа Т-хелперів від загальної кількості ТЕ-РУЛ.

Верифікація В-лімфоцитів базується на особливостях мембранних рецепторів для третього компонента комплексу (C_3) і Fc-фрагменту імуноглобуліну, що забезпечує приєднання до них індикаторних клітин, які утримують на своїй поверхні комплекс антиген-антитіло (ЕАС-РУЛ). Як індикаторні клітини інколи використовують сенсibilізовані антитілами та комплексом ЕБ. Присутні до комплексу у В-лімфоцитів поверхневі мембранні рецептори, дають можливість виявити комплементарні розетки, тобто ті лімфоцити, що утворюють розетки з аналогічними еритроцитами і утримують на мембранах комплекс антитіло-комплемент ЕАС-РУЛ. Методика виявлення В-лімфоцитів (розчини, суспензія ЕБ, проби крові, приготування і мікроскопія мазків, опрацювання результатів) виконується по аналогії з попередньою методикою для Т-лімфоцитів. Основна реакція базувалася на використанні готової рідкої гемолітичної сироватки з титром 1:1200 та готового сухого комплексу морської свинки.

Підготовка системи ЕАС-РУЛ для визначення В-лімфоцитів ($CD22^+$ -клітин). До 0,1 мл чистої суспензії лімфоцитів додавали 0,1 мл 1% суспензії ЕБ, котрі містять на своїй поверхні комплекс імуноглобулін антитіло-комплемент. Суміш інкубували у термостаті протягом 7 хв при температурі 37°C , центрифугували при 1000 хв^{-1} і ставили у холодильник на 69 хв., після чого фіксували 0,3% розчином глутарового альдегіду. Фіксацію припиняли додаванням 0,4 мл дистильованої води. Після центрифугували протягом 5 хв при частоті 1000 хв^{-1} , відбирали надосад. Залишковий осад ресуспендували і робили мазок на предметному склі.

2.4. Методи досліджень біохімічних показників крові

При дослідженні біохімічних показників крові визначали концентрацію ТБК-активних продуктів, вміст гідроперекисів ліпідів, альдегідних ОМП₃₇₀ і кетонів ОМП₄₃₀ похідних ОМП та активність ензимів антиоксидантного захисту (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза) [4].

Визначення активності каталази. Каталаза – це фермент, який прискорює розкладання перекису водню, утвореного під час біологічного окислення води та молекулярного Оксигену ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), а також окисляє високомолекулярні спирти та нітроти в присутності перекису Гідрогену. Каталаза міститься в основному в пероксисомах і гіалоплазмі (цитозолі) та захищає організм від високих концентрацій H_2O_2 . У клітинах тварин пероксид Гідрогену утворюється під час процесів окислення сполук і одразу знешкоджується каталазами, оскільки він є досить агресивним, що викликає руйнування мембран, органел і має мутагенний ефект. Нагромадження токсичних пероксидів жирних кислот, альдегідів і кетонів викликає пригнічення активності ферменту. Каталаза інгібується супероксидним аніон-радикалом, при залізодефіцитній анемії, інтоксикацією етанолом, гіпоксії, активується при гіпероксії, впливі пестицидів, нітратів, солей свинцю та кадмію, за дії іонізуючої радіації.

Метод оснований на властивості пероксиду Гідрогену утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. При визначенні активності каталази ставили дослідну та контрольну проби. У дослідну пробірку вносили 0,1 мл гемолізату еритроцитів (1:10) і 2 мл 0,03% розчину H_2O_2 . У контрольну пробу замість додавали 1 мл 4% розчину молібдату амонію і 2 мл 0,03% розчину пероксиду Гідрогену. Інкубували 10 хв і вносили 1 мл 0,25 N H_2SO_4 . Далі у дослідну пробу додавали 1 мл молібдату амонію, а в контрольну – 0,1 мл гемолізату еритроцитів. Центрифугували 5 хв при 3000 хв⁻¹. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм проти води. Активність каталази (мМоль/хв×мг білка), визначали за наступною формулою:

$$A = \frac{KE - DE \times 4 \times n}{110,6 \times 10 \times 0,1 \times c}$$

де: c – кількість білка в пробі, мг;

КЕ – екстинкція контрольної проби;

ДЕ – екстинкція дослідної проби;

4 – загальний об'єм суміші в кюветі, мл;

n – розведення вихідного екстракту;

0,1 – об'єм екстракту, мл;

110,6 – коефіцієнт екстинкції перекису водню;

10 – час інкубації, хв.

Дослідження ТБК-активних продуктів в плазмі крові. Малоновий діальдегід – один з кінцевих продуктів ПОЛ. Він є маркером не тільки окисного стресу, але й активації запалення, дисліпідемії, вуглеводної нетолерантності, тромбоутворення та артеріальної гіпертензії. Він здатний утворювати полімерні молекули з білками та фосфоліпідами, що зумовлює зниження проникності мембран та просідання активності мембранних ферментів і швидкості обміну фосфоліпідів.

Визначення концентрації МДА. До 0,5 мл плазми крові додавали 5 мл 20% фосфорновольфрамової кислоти, перемішували та залишали на холоді 15 хв. Центрифугування проводили при температурі 4°C протягом 15 хв при 2500 хв⁻¹. Надосадову рідину змивали, а в осад добавляли 2 мл H₂O і 1 мл 0,8% ТБК. Перемішували та інкубували 60 хвилин на водяній бані при температурі 100°C. Охолоджували в холодній воді та центрифугували 10 хв при 6000 хв⁻¹. В отриманому зразку для усунення поглинання зафарбованих комплексів ТБК-речовинами неліпідної природи вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при двох довжинах хвиль 535 і 580 нм. Вміст ТБК-активних продуктів (нмоль/мл), розраховували за формулою:

$$C = 21 + 26,5 \times \Delta D,$$

де: ΔD – показник різниці оптичної густини при довжинах хвиль 535 і 580 нм.

Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів у плазмі крові. Вміст ГПЛ визначається шляхом осаду білків розчином трихлороцтової кислоти та екстракцією ліпідів етанолом з наступною взаємодією досліджуваних екстрактів

з тіоціанатом амонію.

Хід визначення. Виготовлення проб для екстрагування проводили при $t < 4^{\circ}\text{C}$. Плазму крові об'ємом 0,2 мл, яка містила 0,5 мг/мл оксалату натрію в буферному розчині рН 7,4, переносили в пробірку, долучали 2,8 мл етанолу і 0,05 мл 50% розчину CCl_3COOH . Пробірку струшували протягом 5 – 6 хв. Утворений білковий осад виділяли центрифугуванням при 3000 хв^{-1} протягом 10 хв. Етанольний екстракт ліпідів в одержаному супернатанті використовували для визначення ГПЛ.

Визначення гідроперекисів ліпідів. Етанольний екстракт в об'ємі 1,5 мл розбавляли етанолом і додавали 0,02 мл концентрованої HCl і 0,03 мл 1% розчину солі Мора. Вміст струшували і через 0,5 хв. вносили 0,2 мл 20% розчину тіоціанату амонію. Протікання реакції супроводжувалося появою малинового забарвлення. Оптичну густину вимірювали на протязі 10 хв після додавання тіоціанату амонію на спектрофотометрі ($\lambda = 480 \text{ нм}$). Вміст ГПЛ визначали за різницею між дослідним зразком (Д) і контролем (К), в який замість гомогенату додавали відповідну кількість бідистильованої води. Їх вміст у біологічному матеріалі виражають в величинах оптичної густини на 1 мл плазми крові ($\Delta D_{480}/\text{мл плазми}$):

$$\Delta D_{480} (\text{ГПЛ}) = D_{480} (\text{Д}) - D_{480} (\text{К})$$

Вміст альдегідних і кетонів похідних окисної модифікації протеїнів.

Деструкція клітинних протеїнів у процесі окисної модифікації білків у протеосомах призводить до клітинної загибелі, що є ініціюючим механізмом вторинного ушкодження інших біомолекул (ліпідів, ДНК) та розвитку автоімунних реакцій, тобто встановлений безпосередній зв'язок між процесами ОМП і багатьма захворюваннями [90, 198].

Рівень інтенсивності окислювальної деструкції білків виявляли шляхом вимірювання реакції отриманих карбонільних похідних амінокислот і 2,4-динітрофенілгідразину. Карбонільні групи визначали спектрофотометрично за різницею поглинання при 370 нм (альдегідні похідні OMP_{370}) та 430 нм (кетонів похідні OMP_{430}), а вміст карбонілів розраховували за вимірами оптичного поглинання при $\lambda = 370$ та $\lambda = 430 \text{ нм}$ з урахуванням коефіцієнту абсорбції $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. У ході визначення утворювали суміш з 0,1 мл сироватки, 0,9 мл

трихлороцтової кислоти і 1 мл 2,4-динітрофенілгідразину. Далі проводили інкубацію і центрифугували 45 хв при 3000 хв⁻¹. Утворену суміш тричі промивали етанол-ацетатом. Після додавання сечовини і нагрівання протягом 5 хв на киплячій водяній бані проводили вимірювання при вказаних раніше довжинах хвиль, за якими визначали вміст карбонілів (концентрація альдегідних і кетонівих похідних виражається в нмоль/мг білка) [25].

$$KB = \frac{(OD_d - OD_k) \times V_{пр}}{\epsilon_{370} \times \text{білок}} \times 1000$$

де OD_d – оптичне поглинання дослідної проби;

OD_k – оптичне поглинання контрольної проби;

$V_{пр}$ – об'єм гуанідинової проби, мл;

ϵ – коефіцієнт молярної екстинції динітрофенілгідразину, 22000 М⁻¹см⁻¹;

білок – концентрація білка в гуанідиновій пробі (мг/мл).

Визначення активності глутатіонпероксидази. Глутатіонпероксидаза - це фермент, який функціонує як частина системи антиоксидантного захисту клітин. Він служить каталізатором реакції пероксидного окиснення ліпідів з глутатіоном, тим самим значно прискорюючи цей процес. Він є первинною сполукою, яка бере участь у цій реакції, перетворюючись в окиснену форму. Глутатіон має здатність до швидкого відновлення ферментом ГП, що призводить до наступного реагування з молекулами H₂O₂. Окиснені ліпіди або повністю відновлюються, або перетворюються на менш токсичні сполуки. Глутатіон-ферментний комплекс захищає клітинні мембрани від пошкоджень, спричинених розщепленням молекул жирів вільними радикалами. Виміряти, наскільки добре працює ГП, можна за швидкістю розщеплення глутатіону під впливом гідропероксиду третинного бутилу [77, 118].

Концентрацію відновленого глутатіону визначають при допомозі колориметру – до і після реакції. В основі кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням забарвленого продукту — тіонітрофенільного. Вміст останнього прямо пропорційний кількості SH-груп, що прореагували з ДТНБК.

Хід визначення. 100 мкл гемолізату інкубували з 830 мкл тріс-НСІ буферу, який містить ЕДТА і NaN₃, протягом 10 хв, додавали 70 мкл гідроперексиду

третинного бутилу та інкубували при 37°C протягом 5 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 10% трихлороцтової кислоти. Проби віджимали у центрифугі протягом 10 хв при 8000 хв⁻¹. У пробірки з 5 мл тріс-НСІ буферу вносили 0,1 мл супернатанту і додавали 100 мкл реактиву Елмана. Через 5 хв вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при $\lambda = 412$ нм. Активність глутатіонпероксидази визначали з наступної залежності:

$$A = \frac{E_k - E_d / 11,4}{5 \times C}$$

де: С – кількість білка в пробі, мг;

E_k – екстинкція контрольної проби;

E_d – екстинкція дослідної проби.

2.5. Виявлення алелів гена BoLA-DRB3 асоційованих з соматичними клітинами молока методом ПЛР-ПДРФ

Для визначення асоціацій в системі «алелі BoLA-DRB3.2 – КСК» було сформовано дві групи корів за показником кількості соматичних клітин у молоці. Відбір проб молока та доставку до лабораторії здійснювали відповідно до ДСТУ ISO 707:2002 [28]. КСК у пробах молока визначали на аналізаторі LACTOSCAN KSK COMPACT.

Перша дослідна група була сформована з корів, у яких кількість соматичних клітин у молоці була меншою від 200000 кл./см³. Здорова молочна залоза підтримує низький або базальний рівень КСК з рівнем до 200000 кл./см³. Міжнародна молочна федерація (IDF) пропонує дещо вище значення у 250000 кл./см³ [137,175]. Однак, для виключення випадкових помилок за верхній поріг вибрано менший показник. До другої групи були відібрані тварини з показником КСК більше 500000 кл./см³. У вибірку включалися лише тварини, у яких було остаточно встановлено діагноз субклінічний мастит [192].

Алельний поліморфізм гена BoLA-DRB3 виявлено на основі ПЛР-ПДРФ [44]. Серед знайдених алелів виконано пошук маркерів асоційованих з високим і низьким рівнем соматичних клітин молока.

Визначення поліморфізму алелів гена BoLA-DRB3 методом ПЛР-ПДРФ.
Частоти алелів визначили на основі аналізу поліморфізму довжини

рестрикційних фрагментів продуктів ампліфікації екзону 2 гена BoLA-DRB3 [250]. ДНК із зразків крові виділяли з використанням стандартних комерційних наборів ДНК-сорб В виробництва компанії AmpliSens відповідно до вимог модифікованих протоколів з використанням набору реагентів для виділення ДНК з рідкої крові. ДНК, виділена зі свіжого біологічного матеріалу, має високу молекулярну масу (40-50 bp) і чистоту речовини ($OD_{260/280\text{ nm}} = 1,6 - 2,0$). Концентрацію і чистоту виділеної ДНК оцінювали за допомогою спектрофотометрії та електрофорезу в 1% агарозному гелі. Для цього на агарозний гель наносили 25, 50 і 100 нг ДНК λ -фага і аліквоти з розчину з невідомою концентрацією. Електрофорез проводили в 1x трисборатному (TBE) буфері (89mM Tris-ОН, 89mM H_3BO_3 , 2mMEDTA) з додаванням EtBr (1 мкг/мл) для фарбування ДНК при постійній напрузі 120 В. Концентрацію ДНК досліджуваних зразків визначали шляхом порівняння інтенсивності флуоресценції аліквот з розчинів з невідомої концентрації та контрольної розтитровки ДНК фагу λ .

Для подальшого аналізу методом гніздової ПЛР ампліфікували ділянку екзона 2 гена BoLA-DRB3 розміром 284 п.н. ПЛР проводили з використанням готових наборів фірми AmpliSens. Для першого раунду реакції використовували наступні праймери: HLO-30 (5'-3': TCCTCTCTCTGCAGCAGCACATTTCC) та HLO-31 (5'-3': TCCTCTCTCTGCAGCAGCACATTTCC). Як матрицю, використано 5 мкл ДНК, незалежно від концентрації. Для другого раунду ПЛР застосовували праймери: HLO-30 і HLO-32 (5'-3': TCGCCGCTGCACAGAACTCCTC). Матрицею служили 2 мкл продуктів ПЛР першого раунду, яка проводилася в ампліфікаторі «Терцік» (фірма «ДНК-технології»). Продукти ПЛР обробляли трьома ендонуклеазами рестрикції: *RsaI*, *HaeIII*, *XhoII* (Promega, США, New England BioLabs). Електрофоретичний поділ фрагментів рестрикції ДНК проводили в 4% агарозному гелі (агароза «TopVision™ LE GQ» «Fermentas», Литва) та 9–12% поліакриламідних гелях в трис-боратному буфері для електрофорезу. Агарозний гель піддавали електрофорезу в горизонтальній камері протягом 1-3 годин при напрузі 2 В/см. Електрофорез поліакриламідного гелю проводили у вертикальній камері протягом 10–12 годин при напрузі 80 В. Гелі фарбували бромистим етидієм. Фрагменти ДНК візуалізували в УФ-

трансільюмінаторі при $\lambda = 280$ нм. Для вимірювання розміру патернів використовували маркер молекулярної маси GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (Fermentas, Литва). Отримані фореграми аналізували візуально (рис.2.2).

Ампліфікація екзона 2 з подальшим аналізом поліморфізму довжини

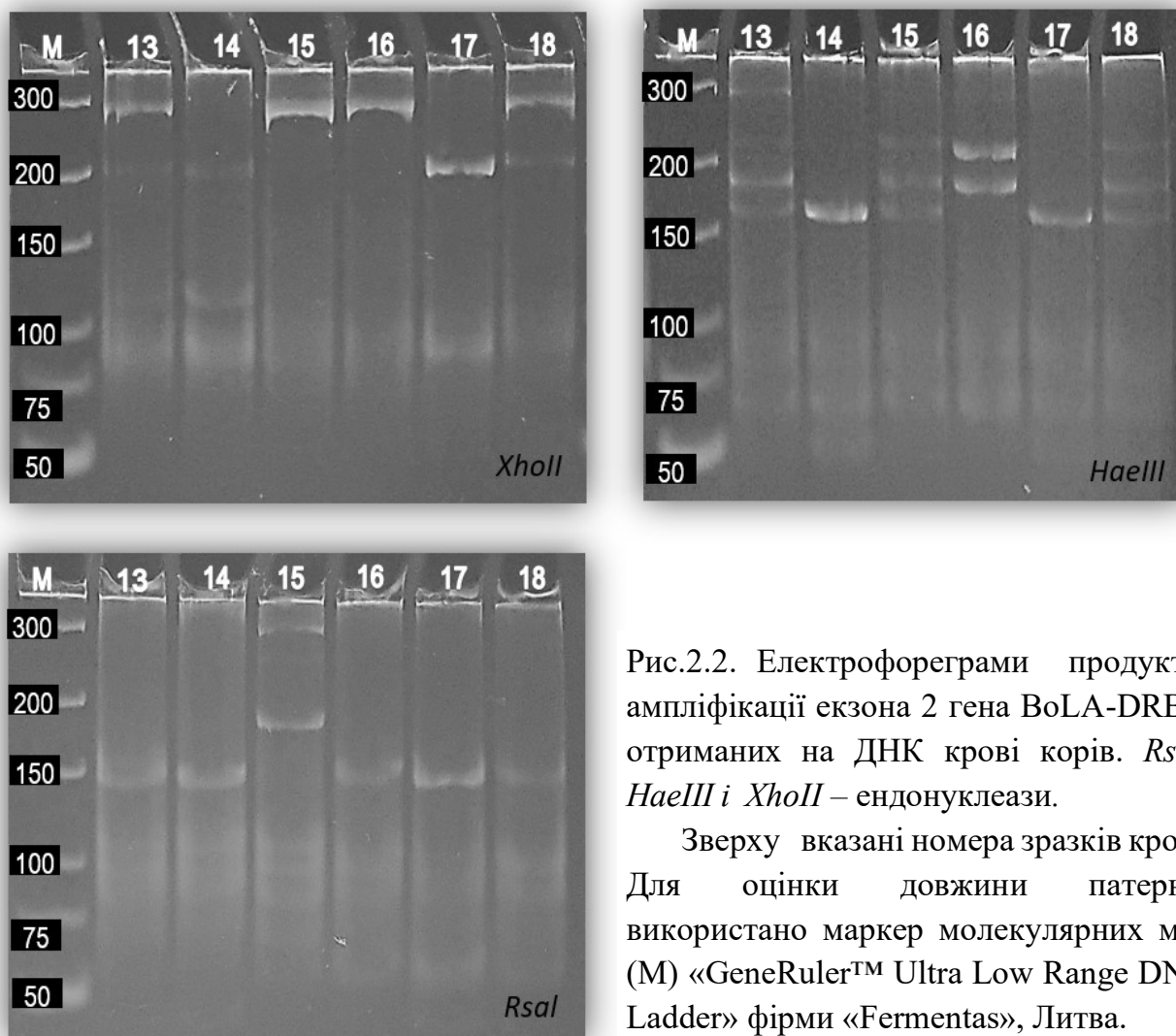


Рис.2.2. Електрофореграми продуктів ампліфікації екзона 2 гена BoLA-DRB3, отриманих на ДНК крові корів. *RsaI*, *HaeIII* і *XhoII* – ендонуклеази.

Зверху вказані номери зразків крові. Для оцінки довжини патернів використано маркер молекулярних мас (M) «GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder» фірми «Fermentas», Литва.

шляхом порівняння ДНК-патернів, отриманих за допомогою ендонуклеаз *RsaI*, *HaeIII* і *XhoII*, дозволяє ідентифікувати 54 алеля гена.

Основним показником, який вказує на силу асоціації між алелем гена BoLA-DRB3.2 та КСК був відносний ризик (*a*, *c* – зразки крові від тварин з високим рівнем КСК, які мають або не мають відповідний алель; *b*, *d* – зразки крові від тварин з низьким рівнем КСК, які мають або не мають відповідний алель):

$$RR = ad/bc.$$

При значеннях $RR \leq 0,5$ наявність алеля в генотипі корови вказує на

позитивну асоціацію (стійкість до захворювання), а значення відносного ризику для зручності інтерпретації визначається, як $-RR^{-1}$.

Статистичну достовірність отриманих значень ризику для двох альтернатив оцінювали за критерієм χ^2 : *високий рівень КСК ↔ низький рівень КСК* та *алель: присутній ↔ відсутній* при ступені свободи $dF = 1$ та довірчого інтервалу у 95% (N – число відповідних генотипів у вибірці):

$$\chi^2 = \frac{N(ad - bc)^2}{(a + b)(a + c)(b + d)(c + d)}.$$

Для двох альтернатив при числі ступенів свободи рівному $dF = 1$ значення χ^2 складуть: для $p = 0,95 \rightarrow \chi^2 = 3,84$; для $p = 0,99 \rightarrow \chi^2 = 6,63$; для $p = 0,999 \rightarrow \chi^2 = 10,8$. Якщо кількість виявлених алелів не перевищувала 5, то розрахунок критерію проводився з поправкою Йетса.

Значення χ^2 має сенс у тому випадку, коли у вибірці нараховується не менше 20 тварин і виконуються наступні умови:

$$(a+b) \times (a+c)/N > 5, (a+b) \times (b+d)/N > 5, (c+d) \times (a+c)/N > 5, (c+d) \times (b+d)/N > 5.$$

Перевірку сили асоціацій для алелів, які мають незначні відхилення від достовірності проводили за точним одностороннім критерієм Фішера та коефіцієнтом взаємної спряженості (сполученості) Пірсона.

Статистичний обробіток даних проведено в пакеті «Microsoft Excel 2013» з використанням власних програм. Нормальність розподілу частот алелів виконано за критерієм Шапіро-Уїлка та критерієм згоди Колмогорова-Смірнова в стандартному пакеті IBM SPSS Statistics V28.0 (https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/ru/SSLVMB_24.0.0/spss/product_landing.html). Також в розрахунках використано інтегровану в Excel надбудову GenAlEx 6.503 (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Моніторинг захворюваності корів на мастит в господарствах Хмельницькій області

Для перевірки доцільності поставленої мети та необхідності виконання основних завдань експериментальної роботи проведено аналіз поширеності маститу корів в господарствах Хмельницької області. Дані про рівень захворюваності корів на мастит в отримано за результатами звітів на приховані форми маститів від Головного управління Держпродспоживслужби в Хмельницькій області за 2021 – 2023 роки. В табл.3.1 наведено результати виявлення субклінічного маститу в товарних господарствах області (таблицю адаптовано відповідно до сучасного територіального поділу на 3 райони).

Таблиця 3.1

Інформація про дослідження корів на приховані форми маститу корів в господарствах Хмельницької області за 2021 – 2023 роки

Рік	Назва району	Кількість господарств	Кількість корів зареєстрованих в господарствах	Кількість ідентифікованих корів	Піддано дослідженню на субклінічні форми маститів	Виявлено хворих	% досліджень рік
2021	Шепетівський	30	8467	8467	71241	1140	63,6
	Кам'янець-Подільський	20	3691	3577	30917	679	54,0
	Хмельницький	46	14058	14058	138812	6449	73,2
2022	всього	96	26216	26102	240970	8267	67,0
	Шепетівський	33	8953	8754	69730	1753	60,6
	Кам'янець-Подільський	18	3292	3292	28667	651	55,5
	Хмельницький	45	16191	14439	142002	5300	69,8
	всього	96	28436	26485	240399	7703	64,7
2023	Шепетівський	35	9307	9307	88103	1240	73,6
	Кам'янець-Подільський	21	3183	3183	26093	838	54,8
	Хмельницький	48	16655	14830	143478	5019	73,5
	всього	104	29145	27320	257674	7097	69,8
середнє за 3 роки		99	27932	26636	246348	7689	67,1

Аналіз таблиці показує, що найбільше хворих на мастит корів (8267 голів) виявлено в 2021 році, а найбільш неблагополучним був Центральний Хмельницький регіон, в якому виявлено від 5,02 до 6,45 тис. хворих тварин. Найбільш благополучним за всі 3 роки був Кам'янець-Подільський район, де реєструвалося менше 1 тис. корів з субклінічною формою маститу.

Більш точну інформацію про захворюваність та її динаміку за 2021 – 2023 роки показано на рис.3.1, де враховано відношення хворих корів до загальної чисельності обстежених тварин. Середній рівень субклінічних маститів склав 28,9%, що перевищує середній показник для Західного регіону на 4%.

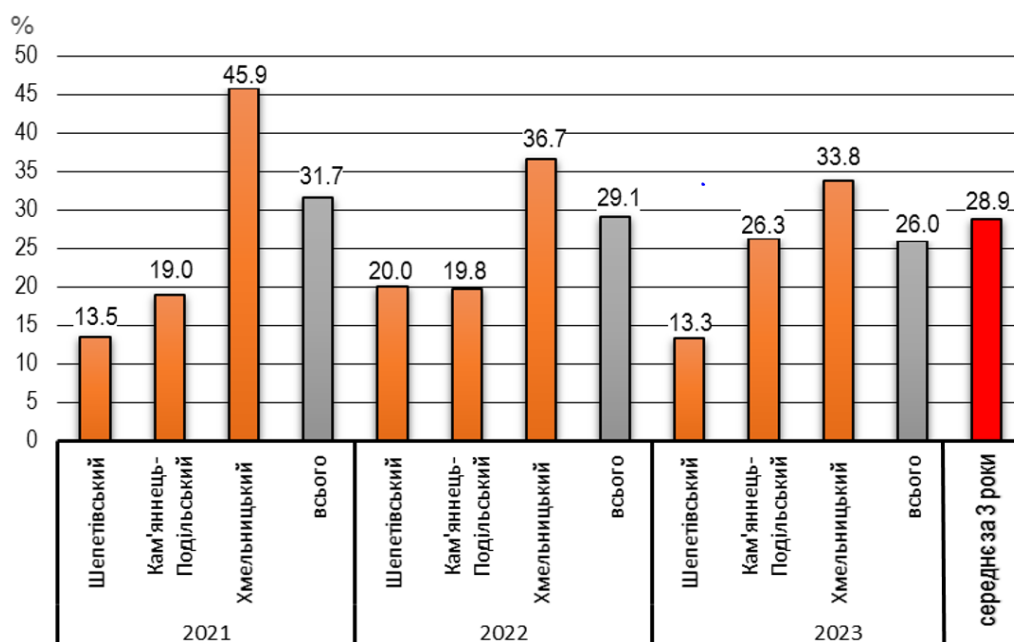


Рис.3.1. Динаміка поширеності маститів в господарствах Хмельницької області за три роки

Дані таблиці підтверджують зроблені вище спостереження для товарних господарств, крім одного висновку: найменша частка хворих корів спостерігається в Шепетівському районі.

Далі приведено результати досліджень на субклінічний мастит в особистих підсобних господарствах населення в динаміці трьох років (табл.3.2).

Досить неблагополучним по приватним господарствам був 2021 рік, коли в результаті досліджень було виявлено майже 9 тис. хворих корів. Найбільш проблемним знову був Хмельницький район, в якому виявлено 91% маститних тварин. В наступні роки рівень захворюваності різко скоротився і зараз сягає близько 5 тис. голів. В основному прогрес досягнуто за рахунок зменшення

захворюваності більш ніж у 3 рази в Центральному регіоні.

Таблиця 3.2

Інформація про дослідження корів на приховані форми маститів в особистих підсобних господарствах населення Хмельницької області за 2021 – 2023 роки

Рік	Назва району	Кількість населених пунктів	Кількість корів зареєстрованих в населеному пункті	Кількість ідентифікованих корів	Піддано дослідженню на субклінічні форми	Виявлено хворих корів	% досліджень за рік
2021	Шепетівський	345	16597	15575	88202	572	43,8
	Кам'янець-Подільський	291	10801	9348	60820	224	46,8
	Хмельницький	668	33520	31777	199668	8048	48,5
	всього	1304	60918	56700	348690	8844	47,0
2022	Шепетівський	276	16005	14873	71329	944	36,4
	Кам'янець-Подільський	291	8628	7801	52340	620	49,8
	Хмельницький	663	31318	29590	183586	2224	67,1
	всього	1230	55951	52264	307255	3788	56,0
2023	Шепетівський	346	13952	13966	78638	740	46,8
	Кам'янець-Подільський	291	7935	6475	43565	160	45,5
	Хмельницький	665	28171	26682	168470	2528	43,9
	всього	1302	50058	47123	290673	3428	45,0
середнє за 3 роки		1279	55642	52029	315539	5053	49,3

Виявлена частка корів з субклінічним маститом в особистих підсобних господарствах населення підтверджує дані табл.3.2. (рис.3.2). Максимальний рівень виявлених маститів був у 2021 році в Хмельницькому районі (25,3%), а мінімальний – у Південному Кам'янець-Подільському регіоні (2,4%). Середні показники захворюваності нижчі ніж у товарних господарствах майже у 3 рази. Подібна ситуація характерна для інших областей та регіонів, що пояснюється відсутністю контамінації збудників маститів в приватних господарствах, де кількість одночасного утримання в одному приміщенні не перевищує 2–3 голови.

Отримані результати не можна вважати вичерпними, адже частка обстежених тварин не перевищує $\frac{2}{3}$ для товарних, і лише $\frac{1}{2}$ для особистих підсобних господарств. Як правило, більшість необстежених корів мають різні форми

маститів, які в силу особистих причин власники намагаються приховати. Тому реальна картина захворюваності корів на мастит має схильність до збільшення відносно виявлених випадків. Ще одна з причин полягає у пізній діагностиці при виявленні патологій молочної залози, в тому числі й маститів [229].

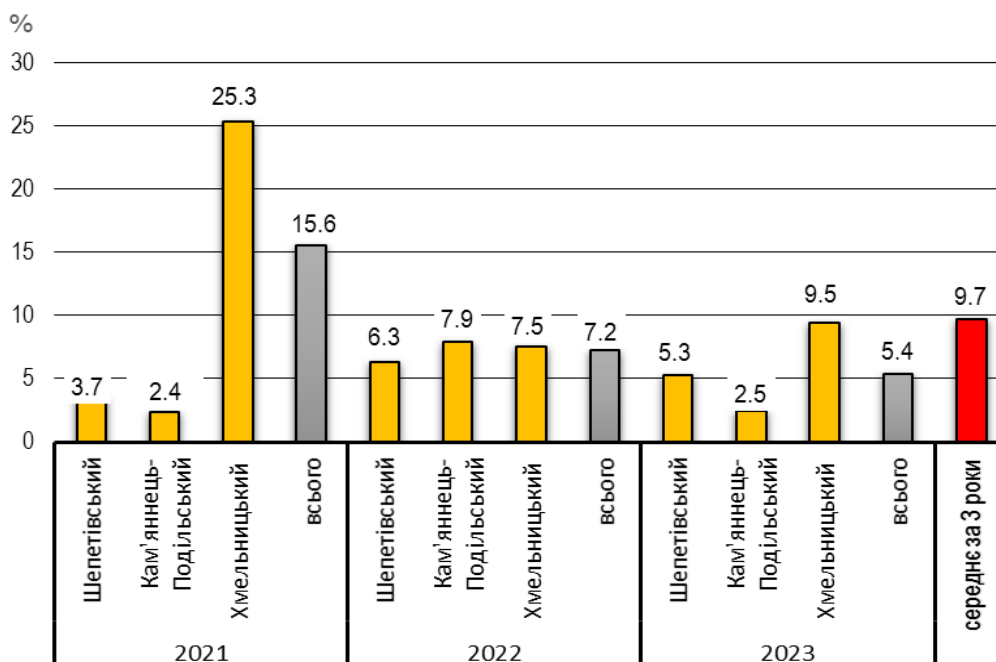


Рис.3.2. Динаміка поширеності маститів в особистих підсобних господарствах населення Хмельницької області за три роки

Практичні дослідження виконано в двох господарствах Хмельницької області:

1. Товариство з обмеженою відповідальністю науково-виробнича Агрофірма «Перлина Поділля» Шепетівський район, селище міського типу Білогір'я (далі ТОВ НВА «Перлина Поділля»);
2. Фермерське господарство «Подільська марка» с. Дем'янківці Кам'янець-Подільського району (далі ФГ «Подільська марка»).

ТОВ НВА «Перлина Поділля» потужне аграрне підприємство з давніми традиціями, розвинутим менеджментом виробництва продукції тваринництва та рослинництва. ФГ «Подільська марка» нещодавно створене компактне агроформування з незначними об'ємами виробництва сільськогосподарської продукції, але з досить сучасною системою планування, організації, мотивації та контролю за виробничими процесами. В обох господарствах виробництво молока є пріоритетним напрямком роботи, адже його рентабельність перевищує 20% і має значний попит на серед переробних підприємств молочної галузі.

Однак мастити є основною проблемою, яка суттєво впливає на вартість

кінцевого продукту. Господарства застосовують різні системи для запобігання та лікування запалень молочної залози. Тому порівняння результатів лікування сучасним ліпосомальним препаратом може дати важливі результати щодо можливості застосування подібних засобів у ветеринарній практиці, для оздоровлення молочного стада без застосування антибіотиків.

3.1.1. Характеристика виробничої діяльності, молочної галузі та захворюваності корів на мастит у ТОВ НВА «Перлина Поділля»

Товариство з обмеженою відповідальністю науково-виробнича агрофірма «Перлина Поділля» – є провідним сільськогосподарським підприємством в Україні, визнаним за свою виняткову ефективність у виробництві сільськогосподарських культур у Хмельницькій області та на міжнародному рівні. Товариство виробляє рослинницьку та тваринницьку продукцію. Площа оброблюваних угідь близько 6800 га. Господарство є племінним заводом із розведення голштинської й української червоно-рябої молочної порід великої рогатої худоби. Незначна частка поголів'я припадає на українську чорно-рябу молочну худобу. Усього утримується 2400 голів ВРХ, з яких 1143 дійні корови. В 2021–22 роках господарство імпортувало майже 400 польських племінних нетелів. Загальне виробництво молока в 2022 році склало понад 20 тис. тон. Середній надій за 2018 рік по підприємству становив 8800 кг молока, а в 2023 році в досяг планки у 10500 кг на дійну корову. В середньому за добу реалізується 32 тони молока, з яких 25 тон належать до гатунку «Екстра». Сировину поставляють на Тернопільський молокозавод, який реалізує перероблену молочну продукцію під брендом «Молокія». Середній надій на дійну корову – 31,7 кг, на фуражну корову – 27,5 кг, середній вміст жиру – 3,9%, середній вміст білка – 3,2%. Дані про молочну продуктивність наведено в табл. 3.3.

За показниками безпечності та якості середній рівень бактеріального забруднення молока по господарству не перевищує 50 тис. КУО/см³, а кількість соматичних клітин – 250 тис. кл./см³.

У структурі товариства три молочні комплекси. МТФ у селі Жижниківці працює з 2011 року. Сьогодні вона виконує роль комплексу для нетелів. Сюди доправляють телиць віком 12 місяців з двох інших ферм, запліднюють та

повертають назад у 6,5–7 місяців тільності. Крім того, тут тримають 110 корів червоно-рябої породи. Доїльна зала «ялинка» 2×5. МТФ у селі Юрівка. Комплекс після реконструкції здано в експлуатацію у 2012 році. Тримають 500 корів голштинської породи. Доїльна зала «ялинка» 2×12. МТФ у селі Гулівці – основний комплекс з виробництва молока. Першу чергу комплексу після реконструкції запущено 1 грудня 2017 року. Наразі тримають 430 дійних і 60 сухостійних корів. Основна порода корів – голштини. Після завершення другої і третьої черги дійне стадо налічуватиме 1000 корів і працюватиме дві доїльні зали. Корів доять тричі у залі типу «ялинка» 2×12. Добовий надій становить 28,4 кг молока на дійну корову, КСК – 180–200 тис. кл./см³, бактеріальна забрудненість – 30–32 тис. КУО/см³. Проводиться щоденний контроль надоїв та електропровідності молока (<http://milkua.info/uk/post/tov-nv-agrofirma-perlina-podilla>).

Таблиця 3.3

Продуктивність корів по лактаціях

Лактація	Середній надій (кг)
1	28,3
2	34,6
3	37,4
4	29,7
5	31,9
6	29,9

Сухостійних корів утримують на глибокій солом'яній підстилці з вільним виходом на вигульні майданчики. В основному тварин вибраковують через проблеми пов'язані з запаленнями молочної залози, гінекологію, некробактеріоз, низьку продуктивність і вади конституції. Середня тривалість використання корови – 2,95 лактації. Облік й управління стадом здійснюється на основі автоматизованого програмного забезпечення UniformAgri і DairyPlan. Для лікування захворювань молочної залози використовувались антибіотики: марбофлоксацин, амоксицилін, спіраміцин і шприц-туби: Гамарет, Мастієт-форте та мазь Елемі.

В ТОВ науково-виробнича агрофірма «Перлина Поділля» дослідження на клінічні та субклінічні форми маститів проводились в період з 2021 по 2023 рік. Дослідження проведено на фермах в селах Юрівка та Гулівці. Кількість обстежених тварин із-за об'єктивних та суб'єктивних причин щорічно змінювалась. Орієнтовний відсоток протестованих корів склав 2021 рік – 50,9%, 2022 – 53,1%, 2023 рік – 57,9%. Дані досліджень приведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Захворюваність корів на мастит в господарстві ТОВ НВА «Перлина Поділля»

Роки	Кількість обстежених корів		Хворі на мастит		Форми маститів			
					субклінічний		клінічний	
	голів	%	голів	%	голів	%	голів	%
2021	563	100	99	17,6	82	14,6	10	1,8
2022	621	100	109	17,1	90	14,5	17	2,7
2023	650	100	119	18,3	93	14,3	24	3,7
Середнє за 3 роки	611,3	100	109	17,8	88,3	14,5	17	2,8

Примітка. Не вказано кількість корів з атрофією вим'я, частка яких у всіх дослідженнях не перевищувала 1%.

Так як поголів'я обстежених корів, а також загальна їх кількість в господарстві щорічно змінюється, то об'єктивним показником була частка хворих на мастити тварин. Дані таблиці показують, що загальна захворюваність за останні три роки суттєво не змінювалась і коливалась в межах 17,1–18,3%. Більшість тварини хворіють на приховані форми маститів. Для даної форми захворювання характерні менші відхилення, середня частка яких за три роки склала 14,5%. Доля клінічних маститів досить незначна і варіювала в межах від 1,8 до 3,7%. Атрофія вим'я зустрічається досить рідко і в жодному річному дослідженні не перевищувала 1%.

Отримані дані свідчать про стабільний рівень захворюваності в господарстві. Подібний підсумок можна трактувати як позитивний результат менеджменту щодо виявлення, запобігання та лікування патологій молочної залози у ТОВ НВА «Перлина Поділля», адже отримані дані по області значно перевищують отримані нами показники.

3.1.2. Підприємницька діяльність, виробництво молока та захворюваність корів на мастит в ФГ «Подільська марка»

Фермерське господарство «Подільська марка» відноситься до суб'єктів малого підприємництва. Це досить молоде агроформування засноване в 2005 році. ФГ «Подільська Марка» територіально розташовувалось в Дунаєвецькому районі Хмельницької області (з 2020 року, в результаті адміністративно-територіальної реформи увійшло до складу Кам'янець-Подільського району). На площі у 2728 га вирощують великий асортимент культур – озиму пшеницю, ячмінь, кукурудзу, соняшник, сою, горох, жито, ріпак, що дає можливість мати власну кормову базу для тваринництва.

Господарство має понад 500 голів ВРХ, з яких 274 корови молочного стада, птахівничий комплекс з виробництва майже 70 тис. птахів-бройлерів та власний переробний цех. Такий комплексний підхід дозволяє максимально диверсифікувати агроризики, що дозволило в 2023 році отримати чистий прибуток понад 12 млн. грн.

Виробництво молока склало 3463,8 тон. голів з середньорічною продуктивністю 8900 кг. Господарство продовжує розпочату роботу з розвитку молочного та м'ясного тваринництва. На фермі в с. Дем'янківці утримуються чорно-ряба та голштинська породи ВРХ. Продовжуються роботи по реконструкції старих приміщень, побудованих 30-40 років назад. Утримання тварин у господарстві безприв'язне. Підлога в корівниках дерев'яна.

Господарство використовує сучасні технології утримання, відгодівлі та доїння корів. Ферма має сучасну доїльну залу оснащену обладнанням компанії DeLaval типу «карусель» на 24 корови, яка реалізує нову методику машинного доїння – Flow-Responsive Milking™. Інноваційна розробка використовує фактичний потік молока для регулювання вакууму та пульсації під час доїння. Якість молока забезпечується комплексними зусиллями. Це збалансований раціон корів, належна робота ветеринарної служби, мінімізація людського втручання у процес доїння та ретельне очищення систем транспортування молока.

Останніми роками агропідприємство взяло курс на голштинізацію

молочного стада. Молочна продуктивність складає 22 літри на корову, а приріст бичків – 1100 грам. Продукція класу «екстра» та вищого гатунку реалізується на Дунаєвецький та Вінковоцький молокозаводи.

Дослідження на клінічні та субклінічні форми маститів ФГ «Подільська марка» проводились з 2021 по 2023 рік. Кількість обстежених тварин сягала 80–85%. Результати обстеження показано в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Захворюваність корів на мастит в ФГ «Подільська марка»

Роки	Кількість обстежених корів		Хворі на мастит		Форми маститів			
					субклінічний		клінічний	
	голів	%	голів	%	голів	%	голів	%
2021	235	100	36	15,3	32	13,6	7	3,0
2022	229	100	36	15,7	30	13,1	6	2,6
2023	220	100	30	13,6	26	11,8	4	1,8
Середнє за 3 роки	228	100	34	14,9	29,3	12,9	5,7	2,5

Примітка. В господарстві не виявлялися корови з атрофією вим'я.

За три останніх роки відмічаються позитивні зміни щодо захворюваності на мастити. Необхідно відмітити скорочення загальної патології молочної залози на 2%. Також зменшилася кількість субклінічних форм маститів на 2,8%. Клінічні форми захворювання в середньому складають біля 2%.

Виявлені показники значно менші ніж показники по Кам'янець-Подільському району (19–26,3%), та по області в цілому (26–31,7%), що свідчить про досить високий рівень утримання та годівлі тварин в господарстві.

Захворюваність корів на різні форми маститу коливалася упродовж року (рис.3.3). Найбільше хворих тварин спостерігалось в літні місяці (червень – липень) та взимку в січні. У ці місяці хворіло по 30 корів, з яких повторний перебіг захворювання складав 6, 12 і 14 тварин відповідно. Найменше хворих корів було у травні, грудні та вересні. Серед клінічних маститів найчастіше спостерігалася катаральна форма, гнійно-катаральний мастит визначався лише у 2% хворих тварин.

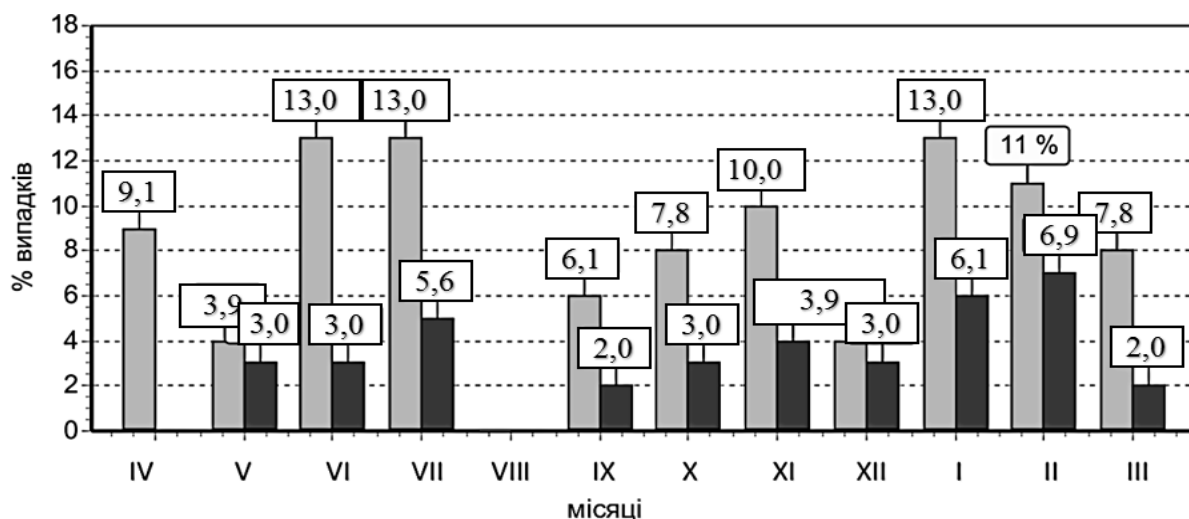


Рис.3.3. Захворюваність корів на мастит по місяцям: сірий колір – субклінічна, темний – клінічна форма

Постійні перевірки захворюваності на мастит, починаючи з отелення показали, що найчастіше корови хворіли у другій та третій частині лактації (по 20%) починаючи з 121 доби до її закінчення (рис.3.4).

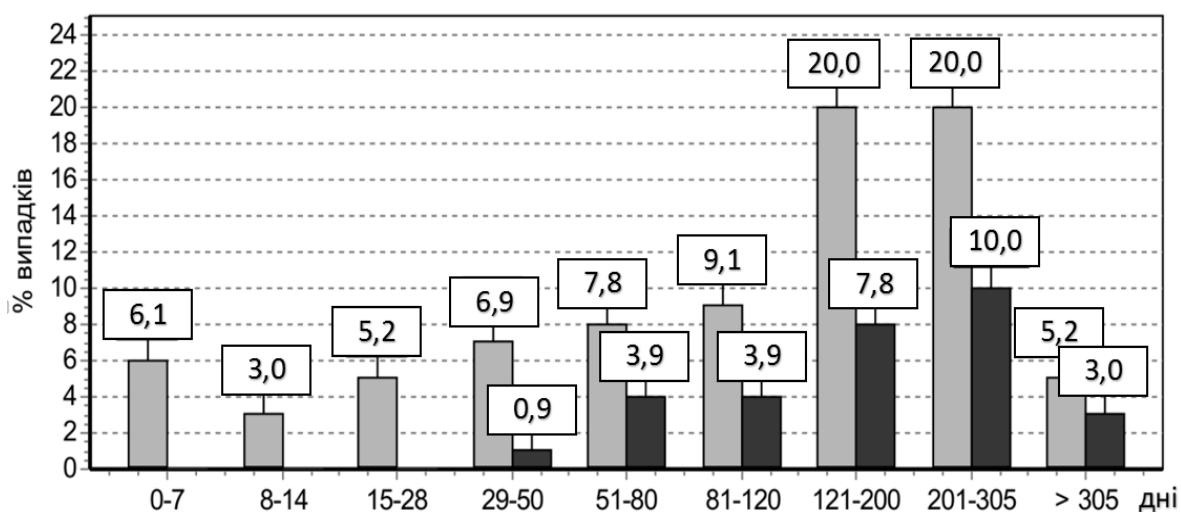


Рис.3.4. Потижневий графік захворюваності на мастит починаючи з отелення

Повторний перебіг захворювання діагностовано у 18 (7,8%) і у 23 корів (10%). У перший тиждень після отелення субклінічний мастит виявлено у 14 корів і одна тварина перехворіла гнійно-катаральною формою. Починаючи з 15 доби після отелення з'явилися ознаки серозних мастити.

Дослідженнями захворювань по лактаціям встановлено, що найбільше маститів приходилось на третю лактацію (рис.3.5). Було зафіксовано 54 випадки захворювання (23,5%), з яких у 24 корів воно проявилось повторно. У третини

тварин ураження виникало в тій самій чверті, що й попереднього разу.

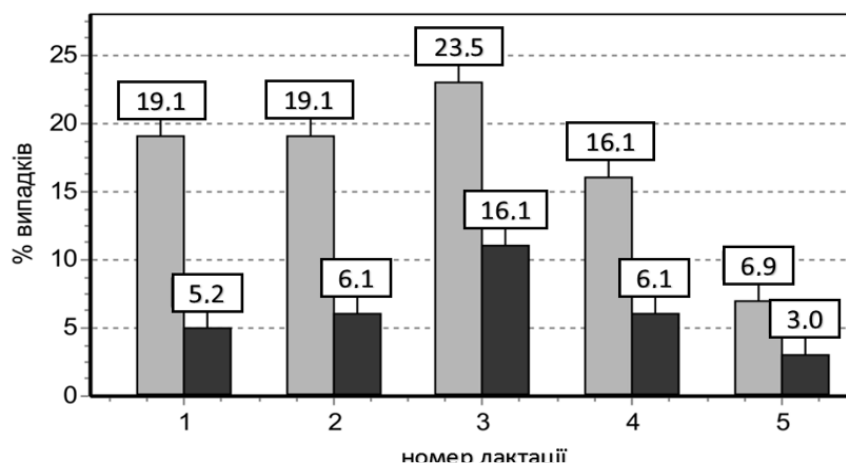


Рис.3.5. Динаміка маститу корів по лактаціям

Аналіз поширення маститу по чвертям показав, що найчастіше уражались задні праві чверті вим'я (33,6%). Повторні випадки (37,5 %) теж найчастіше стосувалися цієї частини вим'я (табл.3.6).

Таблиця 3.6

Загальні ураження чвертей вим'я при маститах

<i>Передня ліва</i>		<i>Передня права</i>	
Випадки	30	Випадки	22
Кількість корів	22	Кількість корів	18
Кількість повторів	8	Кількість повторів	4
<i>Задня ліва</i>		<i>Задня права</i>	
Випадки	31	Випадки	42
Кількість корів	28	Кількість корів	33
Кількість повторів	3	Кількість повторів	9

Якщо порівнювати праву і ліву половини вим'я то кількість випадків захворювань і їх повторів майже не відрізняються, відповідно 26,5% і 27,8% та 18% і 20,3% (повтори до кількості випадків маститів).

Результати досліджень опубліковані в наступних наукових публікаціях:

Строяновська, Л., & Супрович, Т. (2021). Поширення та етіологія маститів у фермерському господарстві. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 100, 16–21. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.04>.

3.2. Мікробіоценози за клінічного та субклінічного маститу у корів

У ході бактеріологічних досліджень 40 проб секрету вим'я від корів з клінічним і субклінічним перебігом маститу було виділено 85 ізолятів мікроорганізмів. Із числа виділених культур 57,6% були представлені грампозитивними коками, 20% – родиною *Enterobacteriaceae*, серед яких *Escherichia coli* становило 12,9%. Домінуючими були стафілококи – 34,1%, стрептококи – 23,6% (рис. 3.6).

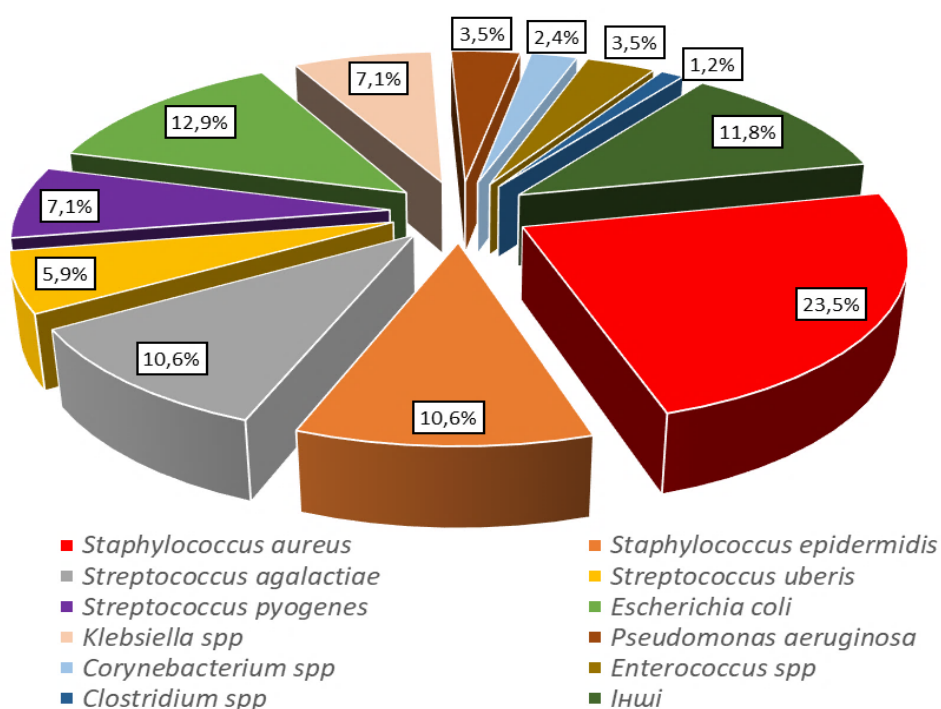


Рис 3.6. Мікробний профіль секрету вим'я корів, хворих на мастит

Аналіз даних бактеріологічного дослідження показав, що етіологічна структура при клінічному і субклінічному маститах дещо різна (табл.3.7).

З 20 зразків молока від корів із субклінічним маститом було ідентифіковано 34 епізоотичні штами мікроорганізмів. Серед загального масиву виділених культур найбільша частка належала бактеріям з родів *Streptococcus* (26,5%), *Staphylococcus* (23,5%) і *Escherichia coli* (11,8%). Виділені мікроорганізми в монокультурі зустрічались в незначній кількості. Так, найбільш поширений золотистий стафілокок у вигляді моноізоляту зустрічався лише 2,9%. У 11,9% ізолятів золотистий стафілокок виділявся в поєднанні з епідермальним стафілококом, коринобактеріями, ентерококом та гнійним стрептококом (по 2,9%).

Таблиця 3.7

Контамінація секрету вим'я залежно від перебігу маститу корів

Збудник	Перебіг захворювання			
	клінічний		субклінічний	
	кількість ізолятів	%	кількість ізолятів	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	27,5	6	17,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	13,7	2	5,9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5	9,8	4	11,8
<i>Streptococcus uberis</i>	3	5,9	2	5,9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	5,9	3	8,8
<i>Escherichia coli</i>	7	13,7	4	11,8
<i>Klebsiella spp</i>	4	7,8	2	5,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	5,9	—	—
<i>Corynebacterium spp</i>	—	—	2	5,9
<i>Enterococcus spp</i>	—	—	3	8,8
<i>Clostridium spp</i>	—	—	1	2,9
Інші	5	9,8	5	14,7

Виділені штами *Staphylococcus aureus* перевіряли на патогенність шляхом визначення гемолітичної активності на кров'яному агарі, ДНК-азної активності, розщеплення маніту в анаеробних умовах та за допомогою постановки реакції плазмокоагуляції.

Streptococcus agalactiae було виділено у 11,8% ізолятів, але лише 5,9% епізоотичних штамів було ідентифіковано у монокультури.

Escherichia coli у монокультури виділялася лише у 2,9% від усіх ізолятів бактерій. Усі виділені культури ешерихій були перевірені на патогенність за допомогою біопроби на білих мишах.

Отримані монокультури *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* та *Escherichia coli* свідчать про потенційну здатність спричиняти патологічний процес у молочній залозі корів при зниженні резистентності організму тварин.

При клінічному перебігу маститу питома вага в етіології захворювання належить стафілококам (41,2%). Стрептококи виділялися менше, ніж у два рази

(21,6%). Зафіксовано аналогічний рівень частоти виділень *Escherichia coli* і *Klebsiella pneumoniae* (сумарно 21,5%). Мікроорганізми найчастіше виділялися у вигляді асоціатів (89,5%). Наприклад, монокультура *Staphylococcus aureus* реєструвалась майже в 9 раз рідше (10,5%). Бактерії *Pseudomonas aeruginosa* та *Streptococcus uberis* виділялася лише в асоціаціях з іншими патогенами (5,9%).

Також нами проведено дослідження чутливості патогенних штамів, виявлених у корів хворих на мастит, до антибактеріальних препаратів (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Чутливість виділених ізолятів мікроорганізмів до антибіотиків

Назва препарату	Кількість ізолятів	Кількість ізолятів чутливих (n)	Кількість ізолятів чутливих (%)
Амоксицилін + клавуланова кислота	40	36	90
Амікацин	24	6	25
Ампіцилін	21	7	33,3
Гентаміцин	40	32	80
Данофлорксацин	31	13	41,9
Доксіциклін	34	31	91,2
Канаміцин	26	19	73,1
Кларитроміцин	25	25	100
Левоміцетин	31	14	45,1
Марбофлорксацин	17	16	94,1
Норфлорксацин	25	8	32
Нітрофурантоїн	31	4	12,9
Неоміцин	34	10	29,4
Офлорксацин	25	12	48
Поліміксін	31	4	12,9
Спіраміцин	14	13	92,8
Тобраміцин	14	10	71,4
Тетрациклін	17	5	29,4
Цефотаксим	31	27	87,1
Ципрофлорксацин	34	30	88,2
Цефтріаксон	25	4	16
Цефазолін	25	14	56

До кларитроміцину були чутливими всі виділені ізоляти мікроорганізмів, до марбофлоксацину – 94,1%, спіраміцину – 92,8%, доксіцикліну – 91,2% та амоксициліну + клавуланової кислоти – 90%. Резистентними виділені культури мікроорганізмів були до нітрофурантоїну і поліміксину (87,1%), цефтріаксону (84%) та амікацину (75%).

Епізоотичні штами *Staphylococcus aureus* виявилися стійкими до 10 антибіотиків з 23 використаних в дослідженні. До інших антибіотиків вони були більш сприйнятливими, але без надмірного росту чутливої зони. *Streptococcus agalactiae* був резистентними до 9 (39,1%) антибактеріальних препаратів. Також високу стійкість до антибіотиків показали епізоотичні штами *Escherichia coli* (47,8%). Результати для ізолятів *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* та *Escherichia coli* показано на рис.3.7.

Перспективність використання ліпосомального препарату на основі ЕТС була попередньо оцінена шляхом визначення антимікробної активності створеної субстанції (рис.3.8).

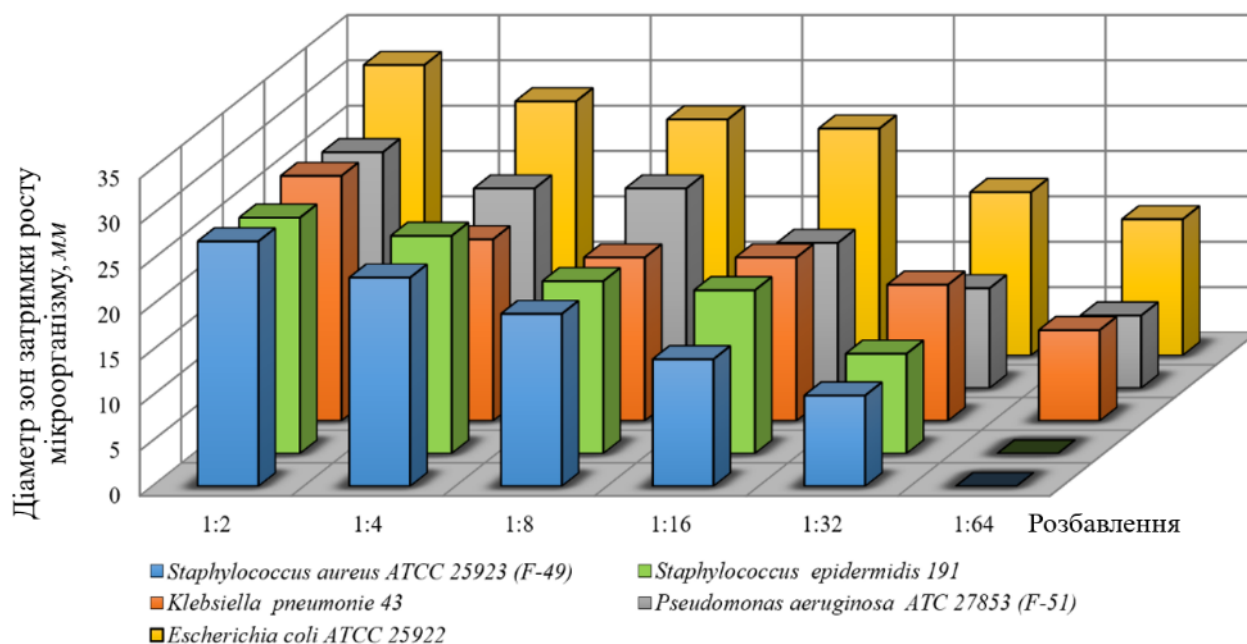


Рис. 3.8. Антимікробна активність етилтіосульфанілату

Результати досліджень ілюструють антимікробну активність етилтіосульфанілату стосовно музейних штамів стафілококів, клебсієл, стрептококів, синьогнійної палички та кишкової палички. Як видно з Рис.3.8

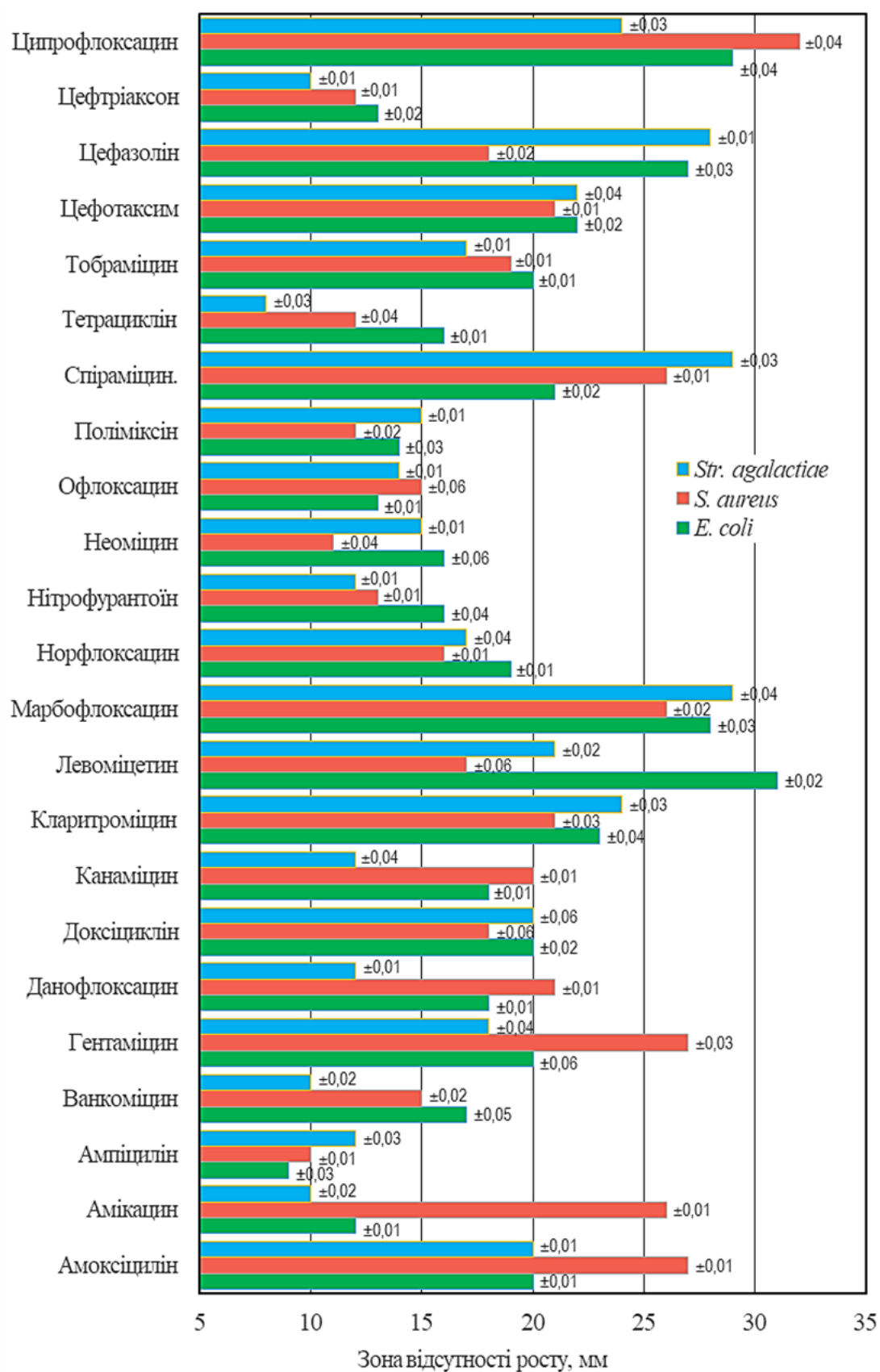


Рис 3.7. Чутливість виділених ізолятів до антибактеріальних препаратів

ЕТС активна по відношенню до *Staphylococcus aureus* у концентрації 0,156%. Їх чутливість зберігалася до розведення 1:16. Патогенні музейні штами *Escherichia coli* проявили більшу чутливість до ЕТС (1:32). Музейні штами епідермального стафілококу, клебсієли та синьогнійної палички, які часто виділяються у мікроіоценозах за маститу корів, також проявляли високу чутливість до обраного препарату. Отримані дані свідчить про перспективність використання даної речовини при лікуванні запалень обумовлених *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*.

Отже, за результатами дослідження можна підсумувати, що бактеріальна етіологія за клінічного і субклінічного перебігу маститу корів має свої особливості. За клінічного перебігу в асоціаціях патогенних мікроорганізмів питома вага належить стафілококам (41,2%). За прихованого перебігу захворювання переважають представники роду *Streptococcus* (26,5%) та *Staphylococcus* (23,5%).

Епізоотичні штами *Staphylococcus aureus* в проявили помірну резистентність до 43,5% антибактеріальних препаратів, *Streptococcus agalactiae* – до 39,1%, *Escherichia coli* – 47,8%.

Найбільш поширені збудники маститу корів проявляють високу чутливість до ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату.

Результати досліджень опубліковані в наступних наукових публікаціях:

Строяновська, Л., & Супрович, Т. (2021). Поширення та етіологія маститів у фермерському господарстві. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 100, 16–21. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.04>.

Suprovych, T., **Stroianovska, L.**, Vishchur, O., Havryliak, V., Vasylyuk, S., Masyuk, M., Solovodzinska, I., & Lubenets, V. (2023). Influence of liposomal thiosulfonate drug on the blood parameters of cows suffering catarrhal mastitis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(2), 195–202. <https://doi.org/10.15421/022329>.

3.3. Вплив ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на біохімічні показники крові та імунобіологічну реактивність організму корів за катаральної форми маститу

3.3.1. Вплив ліпосомального препарату на основі ЕТС на морфологічні та біохімічні показники корів хворих на катаральний мастит

Клінічна симптоматика катарального маститу при однакових складових менеджменту на фермах залежала лише від особливостей етіологічного чинника, перебігу процесу та індивідуальними особливостями організму корови. Патологічний процес супроводжувався запальною реакцією з вираженою катаральною ексудацією. Загальний стан тварини оцінювався як задовільний. Під час пальпації ураженої чверті вим'я виявлено підвищення місцевої температури та незначну болючість ущільнених тканин. Секреція молока знижувалась. В ураженій частці виявлялося водянисте молоко зі згустками та пластівцями казеїну.

Лікування ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату хворих на катаральний мастит корів супроводжувалося змінами складових гематологічного профілю крові (табл. 3.9)¹.

Хворі тварини у порівнянні з клінічно здоровими зазвичай мають менший вміст гемоглобіну та кількість еритроцитів. Після введення ліпосомального препарату спостерігалось зростання їх концентрації. Якщо вміст гемоглобіну відносно контрольної вибірки на першу добу був меншим на 8,96% ($P < 0,05$), то на сьому добу мали перевищення показника на 1,8%. При цьому виявлення відхилення в сторону зростання відносно першого введення препарату склало 10,9% і було вірогідним ($P < 0,05$).

Для еритроцитів отримано аналогічні відхилення. Якщо їхній вміст відносно контрольної вибірки на першу добу був меншим на 7,78% ($P < 0,05$), то на сьомий день перевищення показника практично не відрізнялось від контролю. Відхилення в сторону збільшення відносно початку дослідження склало 8,6% і було статистично значимим ($P < 0,05$).

¹ Тут і далі в таблицях: x – кількісний показник в прийнятих одиницях вимірювання; M – частка в групі однотипних показників (%) за умови $\sum M_i = 100\%$.

Таблиця 3.9

Гематологічні та біохімічні показники крові корів з катаральною формою маститу,

$$\bar{x} \pm SE; n = 7$$

Показники	Група ² тварин	Період дослідження ³		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Гемоглобін, г/л	К	102,2±0,96		
	Д	93,8±1,14*	99,1±0,96	104,0±1,04°
Еритроцити, 10 ¹² /л	К	6,51±0,22		
	Д	6,04±0,13*	6,39±0,14	6,56±0,13°
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	К	7,52±0,18		
	Д	11,5±0,33***	9,97±0,25°	9,56±0,21°*
Загальний протеїн, г/л	К	71,2±0,51		
	Д	67,9±0,43	70,6±0,52	76,1±0,51°

Кількість лейкоцитів до введення препарату на основі ЕТС у крові хворих тварин була більшою на 52,9% ($P < 0,001$), ніж у здорових корів, що вказує на яскраво виражений запальний процес. В подальшому концентрація лейкоцитів дещо зменшилася але перевищувала показники контрольної групи на 32,6 ($P < 0,05$) і 27,1% ($P < 0,05$), відповідно.

Загальний протеїн у сироватці крові хворих корів був меншим на 4,86% у порівнянні з контролем, але знаходився в межах нижньої фізіологічної межі. Після застосування препарату відбувається відновлення абсолютних значень білків у крові маститних тварин. На третю добу приріст склав 4%, а на сьому ще 7,8%. Необхідно відмітити високий рівень динаміки відновлення протеїну, який за сім днів склав 8,2 г/л або 12,1% ($P < 0,05$).

Найбільш інформативними щодо стану імунної системи вважаються лейкоцити, клітини крові, які забезпечують імунний захист організму від патогенів або чужорідних тіл. Але загальна кількість лейкоцитів не дає повного

² Тут і далі в таблицях 3.9 – 3.28: К – контрольна група тварин; Д – дослідна група тварин (етилтіосульфат).

³ Тут і далі в таблицях 3.9 – 3.28: ° – $P < 0,05$, °° – $P < 0,01$, °°° – $P < 0,001$ – для тварин дослідної групи у порівнянні з показниками до введення препарату; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ – у порівнянні з контрольною групою.

уявлення про особливості запального процесу. Необхідно аналізувати лейкограми, на яких приведено відсоткове відношення окремих форм лейкоцитів.

До лейкограми (табл. 3.10) включено експериментальні дані щодо кількості імунокомпетентних клітин – лімфоцитів та мієлобласти: нейтрофіли, еозинофіли, базофіли і моноцити. Результати дослідження показали, що введення ліпосомальної субстанції вплинуло на лейкоцитарний. Оцінка впливу залежить від рівня статистично значимого відхилення, але в ході аналізу необхідно звертати увагу на динаміку змін, які відбулися між показниками у різні дні забору крові. Найбільші відхилення виявляються в середині групи між показниками складових лейкограми в залежності від доби відбору. Так як зміни відбулися за всіма складовими, розглянемо їх у відповідності до розташування у таблиці.

Таблиця 3.10

Лейкограма крові контрольної та експериментальної груп корів (%);
 $M \pm SE; n = 7$

Показники	Групи тварин	Період дослідження		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Лімфоцити	К	57,1±0,83		
	Д	47,0±1,15*	49,3±0,89*	56,0±0,92°
Базофіли	К	0,739±0,13		
	Д	0,813±0,31	0,669±0,44°*	0,83±0,31
Еозинофіли	К	4,82±0,71		
	Д	6,28±0,88°	6,46±1,09*	5,51±0,99
Моноцити	К	3,41±0,41		
	Д	4,19±0,56°	4,08±0,61	3,67±0,42
Паличкоядерні нейтрофіли	К	3,41±0,39		
	Д	9,02±0,53°°°	5,49±0,44°°°*	4,08±0,41°°°*
Сегментоядерні нейтрофіли	К	29,5±1,0		
	Д	32,7±1,12	33,9±1,21	29,9±1,03°

Після введення ліпосомального препарату насиченість лімфоцитами крові корів з катаральною формою маститів поступово зростає. Найбільше

статистично значиме відхилення у 9% ($P < 0,01$) відносно початку дослідження досягнуто на сьому добу. Також значне відхилення лімфоцитів в сторону меншої частки до лікування і на третю добу було вірогідним відносно показників контрольної групи ($P < 0,05$).

Для базофілів, сегментоядерних нейтрофілів і моноцитів показники за даними трьох контролів не мали однозначного вектору щодо зменшення чи зростання їх концентрації у взятих пробах. Для базофілів максимальне відхилення 0,144% ($P < 0,01$) було відносно взятих зразків крові до лікування і 0,07% ($P < 0,01$) для контрольної групи спостерігалось на третю добу після застосування лікувальної форми. Для сегментоядерних нейтрофілів після збільшення відсоткової частки до 33,9% у другій пробі крові на 7 сьому добу відбулося значне її скорочення на 4%, але при мінімальному рівні статистичної значимості ($P < 0,05$). Для моноцитів найбільша вірогідність відхилення була між контрольною групою і даними для дослідної вибірки на початку дослідження ($P < 0,05$). У еозинофілів у процесі лікування мали схожу динаміку показників. Різниця полягала в тому, що вірогідність отриманих відхилень була достовірною, ще й на третю добу після використання препарату. Найбільша різниця в даних виявлена для паличкоядерних нейтрофілів, рівень яких в крові хворих корів до лікування перевищив контрольне значення у 2,65 разів ($P < 0,001$), а на сьому добу у 2,21 рази ($P < 0,001$).

Пероксидне окислення ліпідів є однією з форм тканинного дихання, яке властиве нормальним тканинам і відбувається при побудові та оновленні ліпідних мембранних структур. Однак вільнорадикальне окислення може активізуватися при захворюваннях. В нашому дослідженні встановлено, що запалення молочної залози у корів дослідної групи з катаральним маститом супроводжувалися ростом інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів і корелювали з вмістом їх проміжних продуктів, таких як гідроперекиси ліпідів і ТБК-активні продукти (табл. 3.11).

За результатами дослідження виявлено значне збільшення кількості ГПЛ у плазмі крові корів дослідної групи. Відносно першого відбору зразків крові у хворих корів їхня кількість на сьому добу скоротилася на 38,2% ($P < 0,001$), тоді як відносно контрольної вибірки мали зменшення концентрації на 16,4% ($P <$

0,01). Також, спостерігалось стабільне зменшення ТБК-активних продуктів на сьомий день (7,42%, $P < 0,05$) у групі корів, яким вводили етилтіосульфанілат.

Таблиця 3.11

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у плазмі крові корів,
 $\bar{x} \pm SE; n = 7$

Показники	Групи тварин	Період дослідження		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Гідроперекиси ліпідів, од. Е/мл	К	1,52±0,07		
	Д	1,77±0,11*	1,59±0,11	1,28±0,1 ^{ooo*}
ТБК-активні продукти (МДА), нмоль/мл	К	6,01±0,09		
	Д	6,22±0,14	6,14±0,08	5,79±0,12°

Використання препарату сприяло зменшенню вмісту ТБК-активних продуктів і ГПЛ у корів дослідної групи, що вказує на його нормалізуючий вплив на інтенсивність процесів ПОЛ.

Більш надійним та інформативним індикатором оцінки антиоксидантних механізмів захисту вважаються показники ОМП (табл.3.12).

Таблиця 3.12

Вміст альдегідних і кетонових похідних окисної модифікації протеїнів у сироватці крові корів, нмоль/мг білка, $\bar{x} \pm SE; n = 7$

Показники	Групи тварин	Період дослідження		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Альдегідні похідні окисної модифікації протеїнів (ОМП ₃₇₀)	К	22,3±1,01		
	Д	29,2±1,33**	27,9±1,59**	25,1±1,31°
Кетонові похідні окисної модифікації протеїнів (ОМП ₄₃₀)	К	36,6±1,06		
	Д	41,8±1,09*	37,1±1,03	32,7±1,11 ^{oo*}

За результатами дослідів 1 встановлено, що у тварин з клінічним маститом вміст похідних ОМП₃₇₀ та ОМП₄₃₀ до початку лікування був вірогідно вищим ($P < 0,05-0,01$) порівняно з показниками контрольної групи. Відхилення для альдегідних похідних склало 30,9%, а для кетонових – 14,2%. Застосування експериментального препарату супроводжувалося пригніченням інтенсивності окисних процесів і зменшенням в у крові хворих корів альдегідних похідних ОМП₃₇₀ на 16,3% ($P < 0,05$) на сьому добу лікування. Аналогічна трансформація

виявлена для кетонових похідних з показником 27,8% ($P < 0,01$). Таким чином, введення дослідного препарату нормалізує окисні процеси і не сприяє інтенсифікації ПОЛ або так званого «окисно-карбонільного стресу» для організму у період, яким є захворювання.

При вивченні впливу лікувального препарату в дослідженні визначали активність ензимів антиоксидантного захисту та вміст відновленого глутатіону у крові корів (табл. 3.13).

Застосування комплексного ліпосомального препарату супроводжувалося значними змінами активності ензимів антиоксидантного захисту. Каталазна активність мала стабільну і спрямовану динаміку на збільшення рівня в крові хворих корів сягнувши максимуму на сьому добу з перевищенням показників першого відбору зразків крові на 40,5% ($P < 0,001$). Відносно контрольної вибірки відбулося зростання на 16,5% ($P < 0,05$). Подібні зміни були досить значимими, адже різниця в рівні каталази в крові хворих і здорових корів на першу добу була вірогідно більшою у контрольній групі на 20,5% ($P < 0,05$).

Таблиця 3.13

Активність ензимів антиоксидантного захисту та вміст відновленого глутатіону у крові корів, $\bar{x} \pm SE$; $n = 7$

Показники	Групи тварин	Період дослідження		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Каталаза, одЕ/мл	К	2,41±0,11		
	Д	2,0±0,1*	2,21±0,16	2,81±0,17 ^{oo*}
Супероксиддисмутаза, од.акт./мл	К	22,8±0,92		
	Д	19,2±1,13	22,8±1,04	24,9±1,14 ^{oo}
Глутатіонпероксидаза в плазмі крові, Нм GSH/хв на 1 мг протеїну	К	24,7±1,13		
	Д	20,7±0,98*	22,2±0,98	26,9±1,09 ^{oo}
Відновлений глутатіон в еритроцитах, мкМ/мл	К	0,429±0,019		
	Д	0,404±0,021	0,453±0,015*	0,457±0,012 ^o

Для супероксиддисмутази встановлена аналогічна динаміка, проте ці зміни були виражені меншою мірою. Статистично значимою була лише різниця у 29,7% ($P < 0,01$) між початком експерименту і останньою добою дослідження. Константовано тенденція супероксиддисмутазної активності у еритроцитах

крові корів після введення дослідженого препарату. На сьомий день перевищення склало 30,0% ($P < 0,01$). Відносно контрольної групи цей показник був вищим на 19,3% ($P < 0,05$).

Зміни у показниках відновленого глутатіону були ще менш значимими, але з динамікою щодо збільшення його рівня в крові хворих корів. Відносно першого взяття зразків крові спостерігали зростання показників на третю 12,1% ($P < 0,05$) і на сьому доби 13,1% ($P < 0,05$).

Отже, застосування ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату при катаральній формі маститу мало значний вплив на гематологічні та біохімічні показники крові корів. Попередня оцінка динаміки отриманих показників та їх абсолютних і відносних значень показує позитивний вплив на перебіг лікування у хворих корів після введення препарату.

3.3.2. Вплив ліпосомального препарату на основі ЕТС на клітинний і гуморальний імунітет корів хворих на катаральний мастит

Імунна відповідь організму тварин на дію шкідливих чинників проявляється у посиленій міграції Т- і В-лімфоцитів із тимусу та кісткового мозку. Для їх ідентифікації широко застосовується метод Е-розеткоутворення, в основі якого лежить приєднання до специфічних рецепторів лімфоцитів індикаторних клітин. Тест розеткоутворення дозволяє ідентифікувати різні субпопуляції лімфоцитів та їх вплив на функціональний стан клітин.

Дослідження популяційного та субпопуляційного складу Т- і В-лімфоцитів у крові корів, хворих на катаральний мастит, показали, що їхня імунна система реагує на патологію зниженням кількості імунокомпетентних клітин. Експериментальні дані щодо кількості та функціональної активності часток загальної групи розеткоутворюючих Т-лімфоцитів у периферичній крові корів показали значне переважання їх у групі з низькою щільністю ТЕ-РУЛ (табл.3.14).

Після введення препарату їхня кількість поступово зростала, відповідно, на третю добу на 3,3% ($P < 0,01$) і на сьому добу – 5% ($P < 0,01$). Відповідно,

зменшувалася різниця розеткоутворюючих Т-лімфоцитів низької щільності в порівнянні з контрольною групою тварин. Якщо до початку лікування співвідношення в показниках контрольної і дослідної груп складало 1:1,19 ($P < 0,01$), то на сьому добу воно скоротилася до 1:1,07 ($P < 0,01$).

Таблиця 3.14

Відносна кількість загальних лімфоцитів ТЕ-РУЛ у крові корів (%), $M \pm SE$; $n = 7$

Показники	Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з катаральним маститом)		
		до введення препарату	3-тя доба лікування	7-ма доба від початку лікування
0	32,0±1,04	41,2±0,25***	41,2±0,62***	37,3±0,63* ^o
3–5	53,5±0,28	45,0±0,42**	48,3±0,47* ^o	50,0±0,4** ^{oo}
6–10	13,0±0,57	12,5±0,28	9,5±0,28 ^{oo}	11,2±0,48
<i>M</i>	1,5±0,28	1,3±0,47	1,0±0,08	1,5±0,28
%	68,0±0,51	58,8±0,28***	58,8±0,62*	62,7±0,61*

Примітка. В табл. використано загально вживане позначення високоавідних субпопуляції лімфоцитів, які приєднали більше як 10 еритроцитів літерою *M* (морула).

Суттєві зміни у чисельності Т-лімфоцитів у крові хворих корів відбулися в субпопуляції «нульових», недиференційованих у функціональному відношенні клітин. Їхня кількість у першому та другому зразках крові мали однаковий показник 41,2%, який значно перевищував значення на 9,2% ($P < 0,001$) у контрольній групі. На сьому добу лікування ліпосомальним препаратом призвело до зменшення статистично значимого рівня нульових Т-лімфоцитів: відносно початку дослідження до 4,9% ($P < 0,05$), а порівняно з контролем – до 5,3% ($P < 0,05$).

Загальна кількість розеткоутворюючих Т-лімфоцитів була незмінною на третю добу після введення препарату, і зросла на 3,9% ($P < 0,05$) відносно здорових корів до введення препарату. Незважаючи на це, порівняно з контрольною групою, загальна чисельність ТЕ-РУЛ лімфоцитів на сьому добу була меншою на 5,3% ($P < 0,05$), що вказує на позитивну роль ліпосомального препарату щодо імунної відповіді організму тварин на дію шкідливих чинників.

Дослідженнями кількості активних Т-лімфоцитів (табл.3.15) встановлено,

що їх чисельність у хворих на мастит корів після застосування ліпосомального препарату практично не змінилася. Відхилення відносно дослідної групи хворих тварин склало лише 0,7 і 1,7% на третю і сьому добу лікування ($P > 0,05$). Схожа ситуація була виявлена для субпопуляція «нульових» ТА-РУЛ у хворих тварин, кількість яких склала майже 2/3 від загальної кількості виявлених лімфоцитів. Для всіх дослідних груп виявлена різниця з контрольною групою (сумарно 55,6%) була статистично достовірною ($P < 0,05 \div 0,001$).

Таблиця 3.15

Відносна кількість активних лімфоцитів ТА-РУЛ у крові корів (%),

$M \pm SE; n = 7$

Показники	Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з катаральним маститом)		
		до введення препарату	3-тя доба лікування	7-ма доба від початку лікування
0	55,6±0,47	64,7±0,47***	64,0±0,41**	63,0±0,7*
3–5	35,5±0,34	28,7±0,24***	28,5±0,64**	30,2±0,62**
6–10	7,5±0,22	6,1±0,44	6,8±0,32	6,2±0,48
<i>M</i>	1,41±0,07	0,51±0,28	0,69±0,07	0,61±0,08
%	44,4±0,51	35,3±0,48**	36,0±0,4	37,0±0,7*

У крові хворих на катаральний мастит корів значну перевагу мали малодиференційовані клітини з малою щільністю поверхневих рецепторів ТА-РУЛ (3-5). Відносна чисельність коливалася в межах від 28,5 до 30,2%, що було менше відносно контрольної групи на 23,7% ($P < 0,001$) до використання препарату на третю 24,6% ($P < 0,01$) і сьому добу на 17,5% ($P < 0,01$) після застосування ліпосомального препарату на основі ЕТС.

При оцінці імунного статусу важливе значення необхідно приділяти дослідженню показників ще двох популяцій імунорегуляторних клітин групи Т-лімфоцитів, а саме Т-хелперам (теофілінрезистентні клітини) та Т-супресорам (табл. 3.16).

Введення коровам дослідної групи ліпосомального препарату спричиняло стимулюючий вплив на чисельність теофілінрезистентних лімфоцитів.

Виявлено стійке зменшення частки Th-РУЛ «нульових» Т-лімфоцитів у крові хворих корів на третю 1,2% і сьому 3% ($P < 0,05$) доби експерименту, порівняно з періодом до застосування препарату. Різниця між контрольною і дослідною групами теж була статистично значимою але скоротилася, відповідно, з 4,7% ($P < 0,05$) до 1,7% по мірі тривалості експерименту.

Таблиця 3.16

Відносна кількість хелперів (Th) та супресорів (Ts) у крові корів, (%),

$M \pm SE; n = 7$

Показники		Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з катаральним маститом)		
			до введення препарату	3-тя доба лікування	7-ма доба від початку лікування
Th	0	56,5±0,28	61,2±0,64*	60,0±0,62	58,2±0,62*°
	3–5	36,5±0,28	32,3±0,91**	34,0±0,47	36,0±0,41°
	6–10	7,0±0,41	6,5±0,64	6,0±0,44**	5,8±0,44***
	%	43,5±0,28	38,8±0,64*	40,0±0,63	41,8±0,63°
Ts		24,3±0,25	20,2±0,47*	17,0±0,4°*	18,0±0,4
PI		1,79	1,92	2,35	2,32

Дзеркальне відображення мав розподіл «розеткоутворюючих» Т-лімфоцитів, серед яких явне переважання належало групі з малою щільністю рецепторів (приблизно біля третини від виявлених теофілінрезистентних клітин). Виявлена різниця у 3% ($P < 0,05$) була статистично значимою лише для результатів останнього взяття крові у порівнянні з початком дослідження. Також, вірогідне відхилення виявлено між першим взяттям крові у корів з катаральним маститом і контрольною групою. Група лімфоцитів Th-РУЛ (3–5) в кінцевому підсумку зумовила сумарне збільшення частки «розеткоутворюючих» варіантів на 7 добу на 3,7% ($P < 0,05$) відносно дослідної групи до введення ліпосомального препарату, що в підсумку позначилось на зменшенні різниці по відношенню до контрольної вибірки.

Кількість теофілінчутливих клітин (Ts) мала мінімальну концентрацію на третю добу експерименту. Їхня кількість скоротилася на 3,2% ($P < 0,05$)

порівняно із дослідною групою на початку лікування і на 7,3% ($P < 0,01$) – з контрольною групою вибіркою тварин.

Це зумовило максимальне зростання імунорегуляторного індексу (ІРІ) саме на 3 добу дослідження. Відомо, що даний індекс показує, який саме різновид Т-клітин найбільш активний. В нормі всі групи лімфоцитів працюють злагоджено. Якщо переважає активність Т-супресорів, то виникає зниження імунітету, а в протилежному випадку з'являються автоімунні реакції проти власних тканин організму.

В-лімфоцити (ЕАС-РУЛ) відповідають за більшу частину гуморального імунітету в організмі, оскільки синтезують специфічні імуноглобуліни, а також впливають на активність деяких популяцій Т-лімфоцитів, беручи участь в реакціях клітинного імунітету.

Результати динаміки відносної кількості ЕАС-РУЛ у корів дослідної групи після введення препарату показали відсутність суттєво значимих змін (табл. 3.17). Лише на третю добу частка недиференційованих В-лімфоцитів була на 6,1% більшою ніж в контрольній групі ($P < 0,05$).

Таблиця 3.17

Відносна кількість В-лімфоцитів у крові корів, (%), $M \pm SE$; $n = 7$

Показники	Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з катаральним маститом)		
		до введення препарату	3-тя доба лікування	7-ма доба від початку лікування
0	$57,5 \pm 0,58$	$60,0 \pm 0,71$	$61,0 \pm 0,49^*$	$60,3 \pm 1,03$
3–5	$37,5 \pm 0,33$	$32,0 \pm 0,37^*$	$34,5 \pm 0,38$	$34,0 \pm 0,91$
6–10	$4,7 \pm 0,07$	$5,0 \pm 0,11$	$4,5 \pm 0,08$	$5,7 \pm 0,09^{**}$
%	$39,8 \pm 0,85$	$37,0 \pm 0,51$	$39,0 \pm 0,34^{\circ}$	$39,7 \pm 0,83^{\circ}$

Серед активних значне переваження мали низькоавідні В-лімфоцити. У порівнянні з лімфоцитами з середньою щільністю рецепторів частота їх виявлення була більшою у 5 – 6 разів. Однак, навіть загальна кількість активних В-лімфоцитів з низькою і середньою щільністю рецепторів не перевищила межі у 40% і була значно меншою від показників ЕАС-РУЛ (0). Також необхідно відмітити, що їх

кількість зросла після введення ліпосомального препарату на 3 добу на 5,4% і на 7 добу – на 7,3%. Обидва показники були статистично достовірними ($P < 0,05$).

На заключному етапі досліджено вплив ліпосомального препарату на гуморальні фактори, які відповідають за стрес і резистентність організму. Ці речовини охоплюють широкий спектр хімічних сполук, кожна з яких має власне унікальне походження, структуру та механізм дії. Однак їх об'єднує здатність перешкоджати проникненню та розмноженню патогенних мікроорганізмів за допомогою неспецифічного механізму. Серед гуморальних факторів природного імунітету у дослідженнях найчастіше вивчають наявність у сироватці крові бактерицидної та лізоцимної активності, а також циркулюючих імунних комплексів (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Показники гуморальної ланки природного імунітету організму корів,
 $\bar{x} \pm SE; n = 7$

Показники	Групи тварин	Період дослідження		
		до введення препарату	3-тя доба після початку лікування	7-ма доба після початку лікування
Бактерицидна активність сироватки крові, %	К	41,1 $\pm$ 1,14		
	Д	34,2 $\pm$ 1,06**	40,3 $\pm$ 0,98	43,2 $\pm$ 1,07 ^{oo}
Лізоцимна активність сироватки крові, %	К	21,0 $\pm$ 1,59		
	Д	12,8 $\pm$ 0,78**	18,8 $\pm$ 1,01 ^{oo}	19,0 $\pm$ 0,89 ^{oo}
Циркулюючі імунні комплекси, ммоль/л	К	76,1 $\pm$ 0,72		
	Д	85,9 $\pm$ 1,56*	73,4 $\pm$ 1,44 ^{oo}	70,4 $\pm$ 1,51 ^{ooo*}

При дослідженні показників гуморальної ланки неспецифічних факторів захисту у тварин з клінічною формою маститу привертає значна позитивна динаміка росту бактерицидної активності сироватки крові, яка на третю і сьому добу перевищила відповідний показник у здорових тварин. Найбільша різниця між цими вибірками корів на 6,9% ($P < 0,01$) спостерігалась на початку експерименту. Після введення препарату в групі хворих корів було скорочення на 6,1% на 3 добу і ще на 2,9% на сьому добу при високому рівні достовірності виявленого відхилення ($P < 0,01$).

Важливу роль у природному імунітеті відіграє лізоцим. Його гідролітична, бактеріостатична і бактерицидна активність викликає лізис і затримку росту та розмноження бактерій, а також стимулює фагоцитоз, проліферацію Т- і В-лімфоцитів та утворення антитіл. Дані дослідження ЛАСК повністю відтворюють тенденції описані вище для бактерицидної активності. Отримана динаміка росту лізоциму у хворих корів була позитивною, про що свідчить вірогідна різниця між показниками до введення препарату і третьою (6,0%; $P < 0,01$) та останньою (6,2%; $P < 0,01$) добами дослідження.

Показник неспецифічного імунологічного захисту організму проявляється через вміст у сироватці крові циркулюючих імунних комплексів. Високий рівень ЦІК спостерігається при запальних та аутоімунних процесах. Запалення в організмі корів супроводжується змінами імунобіологічних реакцій, спрямованих на знешкодження та елімінацію чужорідного антигену. Утворення циркулюючих імунних комплексів є фізіологічним механізмом захисту організму тварин, який впливає на активацію клітинного та гуморального імунітету, для усунення патогенів.

У дослідженні встановлено, що кількість ЦІК у сироватці крові під дією ліпосомального препарату зменшилася. Про це свідчить наявність вірогідних відхилень у показниках корів дослідної групи на третю на 17% ($P < 0,01$) і сьому добу експерименту на 22% ($P < 0,001$). Також у корів дослідної групи на початку лікування і на сьому добу на показники ЦІК мали статистично значиме відхилення відносно контрольної групи тварин. До введення препарату спостерігалось переважання ЦІК у групі хворих корів на 12,9% ($P < 0,05$). Інтенсивність впливу ліпосомального препарату була досить значною, і вже на третю добу показник ЦІК був меншим на 3,68% від показників контрольного взяття крові. На сьому добу різниця виросла до статистично значимого значення у 7,64% ($P < 0,05$).

Результати досліджень опубліковані в наступних наукових публікаціях:

Suprovych, T., **Stroianovska, L.**, Vishchur, O., Havryliak, V., Vasylyuk, S., Masyuk, M., Solovodzinska, I., & Lubenets, V. (2023). Influence of liposomal thiosulfonate drug on the blood parameters of cows suffering catarrhal mastitis.

3.4. Вплив ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на біохімічні показники крові та імунобіологічну реактивність організму корів за субклінічного маститу

3.4.1. Морфологічні та біохімічні показники крові корів хворих на субклінічний мастит

Як зазначалося раніше, патологічний процес при субклінічному маститі характеризується відсутністю видимих клінічних ознак. При більш уважному обстеженні можна помітити асиметрію чвертей та потовщення стінок дійки. Молочна залоза корови швидко реагує на будь-які ендogenous зміни, які можуть вплинути на фізичні, хімічні та біологічні властивості молока. Внаслідок цього підвищується рівень аміаку, знижується лізоцимна й бактерицидна активність та змінюється рН молока у лужну сторону. Із-за порушення гемодинаміки судинного русла у секрет із кровоносних судин надходять лейкоцити. Основну частину соматичних клітин у молоці складають злушені епітеліальні та секреторні клітини паренхіми вим'я та нейтрофільні лейкоцити. Спостерігається зниження секреторної властивості молочної залози, зміна фізико-хімічних властивостей молока, збільшення соматичних клітин і наявність у молоці патогенних бактерій, хоча на вигляд воно має звичайну консистенцію та колір. Поступово скорочується молочна продуктивність, а пізні стадії характеризуються погіршенням органолептичних якостей молока.

Розглянемо результати дослідження гематологічного профілю та вмісту протеїнів у крові тварин (табл. 3.19).

У порівнянні з тваринами контрольної групи до початку лікування перевищення лейкоцитів у хворих тварин складало 37,8% ($P < 0,01$). Після введення коровам з субклінічною формою маститу ліпосомального препарату спостерігається поступове скорочення кількості лейкоцитів на 3 добу 14,4% ($P < 0,05$) і ще 18,8% на 7 добу ($P < 0,01$). На завершальному етапі експерименту

рівні лейкоцитів контролю і досліду практично вирівнюються.

Чисельність еритроцитів та гемоглобіну змінилася незначно. Рівень еритроцитів у крові хворих тварин статистично значимо скоротився на сьому добу лікування на 8,82% ($P < 0,05$) відносно початку дослідження. Відхилення показників гемоглобіну на 4,37% було вірогідним лише до введення препарату ($P < 0,05$). Далі спостерігалось вирівнювання експериментальних та контрольних значень.

Таблиця 3.19

Морфологічні параметри та вміст загального протеїну у крові корів, $\bar{x} \pm SE$; $n = 5$

Показники	Групи тварин	Період досліджень		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Гемоглобін, г/л	К	100,4 $\pm$ 1,02		
	Д	96,2 $\pm$ 0,85*	98,1 $\pm$ 1,12	101,4 $\pm$ 1,43
Еритроцити, 10 ¹² /л	К	6,25 $\pm$ 0,19		
	Д	5,89 $\pm$ 0,39	5,92 $\pm$ 0,32	6,41 $\pm$ 0,21°
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	К	7,91 $\pm$ 0,49		
	Д	10,9 $\pm$ 0,53**	9,53 $\pm$ 0,41°*	8,02 $\pm$ 0,32°°
Загальний протеїн, г/л	К	70,4 $\pm$ 1,03		
	Д	66,7 $\pm$ 0,39	70,3 $\pm$ 0,9	76,4 $\pm$ 0,99°°*

Ймовірно значимі відмінності виявлено для показників загального білку на сьому добу після введення хворим коровам ліпосомального препарату. Рівень протеїнів збільшився відносно першої доби на 14,5% ($P < 0,01$) і 8,52% ($P < 0,05$) до показників контрольної вибірки. Морфологічні показники до і після введення коровам з субклінічною формою маститу ЕТС субстанції вказують на загальну позитивну оцінку результатів лікування.

За результатами досліджень корів з субклінічною формою маститу виявлено зміни лейкоцитарного профілю крові експериментальної групи корів. Особливості у співвідношенні окремих форм лейкоцитів при субклінічній формі маститу відображено в табл.3.20. Захворювання корів на субклінічну

форму маститу призвело до достовірного відхилення у бік зростання моноцитів ($P < 0,01$). Кількість інших мієлоїдних клітин крові теж мала тенденцію до росту, але без статистичного підтвердження достовірності. Загальна кількість лімфоцитів, навпаки, знизилася.

Таблиця 3.20

Лейкоцитарний профіль крові корів за субклінічного маститу (%),
 $M \pm SE; n = 5$

Показники	Групи тварин	Період досліджень		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Лімфоцити	К	58,6±1,22		
	Д	52,3±1,32	57,7±1,28	58,4±1,3*
Базофіли	К	0,68±0,52		
	Д	0,69±0,32	1,22±0,47 ^{***}	1,26±0,51 ^{***}
Еозинофіли	К	4,15±0,44		
	Д	4,59±0,62	4,94±0,42 ^{***}	4,95±0,41 ^{***}
Паличкоядерні нейтрофіли	К	4,02±0,47		
	Д	4,71±0,66	4,82±0,46	3,34±0,5 ^{***}
Сегментоядерні нейтрофіли	К	29,0±0,91		
	Д	32,2±1,31	27,9±1,1	27,3±1,06*
Моноцити	К	3,55±0,42		
	Д	5,52±0,55**	5,44±0,62**	4,75±0,44 ^{°*}

Лікування експериментальним препаратом призвело до зростання кількості лімфоцитів, базофілів та еозинофілів. Рівень лімфоцитів у крові хворих корів поступово підвищувався і на третю добу майже зрівнявся з показниками контрольної групи. У порівнянні з даними до лікування збільшення склало 6,1% ($P < 0,05$). Для базофілів зафіксовано більш значимий рівень росту. Зокрема, на третю добу їх кількість збільшилися у 1,83 рази ($P < 0,01$) по відношенню до початку дослідження та у 1,85 разів ($P < 0,01$) порівняно з контрольною вибіркою. На сьому добу результати лікування практично не змінилися при однаковому рівні похибки. Схожі результати, але з меншими відхиленнями та вірогідністю виявлено для еозинофілів. Сумарна кількість лімфоцитів, базофілів та еозинофілів на сьому добу склала 64,6% і перевищила їхню чисельність у

контрольній групі (63,4%). Інші складові лейкоцитарного профілю в результаті лікування показали тенденцію до зменшення їх рівня в крові корів хворих на субклінічну форму маститу.

Так, кількість найбільш поширеної фракції лейкоцитів сегментоядерних нейтрофілів зменшилася на 17,9% ($P < 0,05$) на сьому добу лікування в порівнянні з початковою фазою і знаходилася нижче рівня показників контрольної вибірки, що свідчить про затухання запального процесу. Інші, форми лейкоцитів характеризувалися більш інтенсивним скороченням концентрації. Наприклад, паличкоядерні нейтрофіли, кількість яких зростає при гострій запальній реакції (лейкоцитарна формула зсувається вліво), коли організму потрібно терміново реагувати на інфекцію, зменшилася на сьомий день аж в 1,41 рази ($P < 0,01$) відносно початку лікування, і в 1,2 рази ($P < 0,05$) відносно контрольної групи корів, що свідчить про затухання запального процесу. Аналогічна ситуація виявлена для моноцитів. Різниця полягала лише в ступені статистичної значимості отриманих результатів.

Таким чином, необхідно відмітити, що застосування ліпосомального препарату з субклінічною формою маститу корів спричинило нормалізуючий вплив на лейкоцитарні показники крові.

Як зазначалося в попередньому розділі клініка та перебіг маститу значною мірою залежать від системи антиоксидантного захисту. На початковому етапі для аналізу ступеня ендогенної інтоксикації визначено рівень продуктів пероксидного окиснення ліпідів, негативним наслідком яких є утворення кінцевих ТБК-активних продуктів (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

Вміст проміжних продуктів пероксидного окиснення ліпідів у плазмі крові корів з субклінічним маститом, $\bar{x} \pm SE$; $n = 5$

Показники	Групи тварин	Період досліджень		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Гідроперекиси ліпідів, од. Е/мл	К	1,43±0,08		
	Д	1,98±0,12**	1,76±0,17*	1,29±0,11 ^{ooo}
ТБК-активні продукти (МДА), нмоль/мл	К	6,98±0,38		
	Д	8,87±0,36**	8,33±0,32	7,32±0,34°

Встановлено, що запальні процеси вим'я у корів дослідної групи після застосування лікувального препарату, супроводжувалися зменшенням інтенсивності виділення проміжних продуктів процесів ПОЛ. Кардинально скоротилася кількість гідроперекисів ліпідів. Статистично значиме зміщення результатів отримано на третій та сьомий день після застосування препарату в порівнянні з першою добою експерименту: на третю добу зменшення гідроперекисів склало 12,5% ($P < 0,05$), на сьому – 53,5% ($P < 0,001$), тоді як їх переважання відносно контрольної групи на початку експерименту було 38,5% ($P < 0,01$).

Однотипним виявився вплив дослідного препарату на вміст кінцевих ТБК-активних продуктів. Він був максимальним у тварин дослідної групи на першу добу та перевищив показники контрольної групи на 27,1% ($P < 0,01$). Наступні результати застосування ліпосомального препарату супроводжувалося скороченням рівня МДА, яке на сьому добу експерименту сягнуло 21,2% ($P < 0,05$). Рівень ТБК-активних продуктів наблизився до показника контрольної групи. Розбіжність результатів склала лише 0,34 нмоль/мл або 4,86%, що сумарно з динамікою попереднього показника свідчить про пригнічення етилтіосульфанілатною субстанцією інтенсивності процесів ПОЛ. Досягнутий результат необхідно вважати надзвичайно позитивним, адже застосування ліпосомального препарату не тільки призвело до значного зменшення гідроперекисів ліпідів але й стійкого зменшення концентрації малонового альдегіду. Даний результат досягнуто за високого статистичного рівня достовірності, що вказує на застосований препарат, як на реальну лікувальну форму за маститу корів.

Схожу динаміку у тварин дослідної групи виявлено при дослідженні окисної модифікації протеїнів (табл. 3.22).

Результати експерименту показали, що у тварин з ознаками субклінічного маститу вміст похідних ОМП₃₇₀ та ОМП₄₃₀ до початку лікування був вірогідно вищим ($P < 0,05$) порівняно з показниками у корів контрольної групи. Відхилення альдегідних похідних склало 12,3%, а для кетонів – 19,4%.

Застосування експериментального препарату викликало пригнічення інтенсивності окисних процесів, на що вказує більш низький вміст на 25% ($P < 0,05$) у крові корів дослідної групи альдегідних похідних ОМП₃₇₀ на сьому добу лікування. Аналогічні зміни зафіксовано для вмісту кетонових похідних. Однак виявлене відхилення не було статистично значимим. Таким чином, можна зробити висновок, що введення експериментального препарату на основі ЕТС призводить до нормалізації окислювальних процесів, не викликаючи при цьому інтенсифікації пероксидного окиснення жирів. Це особливо важливо в стресові для організму періоди, такі як захворювання на субклінічну форму маститу.

Таблиця 3.22

Дослідження показників окисної модифікації протеїнів у сироватці крові корів з субклінічним маститом, $\bar{x} \pm SE$; $n = 5$

Показники	Групи тварин	Період досліджень		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
Альдегідні похідні окисної модифікації протеїнів (ОМП ₃₇₀)	К	22,7 $\pm$ 1,33		
	Д	25,5 $\pm$ 1,11*	23,4 $\pm$ 2,1	20,4 $\pm$ 1,61°
Кетонові похідні окисної модифікації протеїнів (ОМП ₄₃₀)	К	29,4 $\pm$ 1,48		
	Д	35,1 $\pm$ 2,08*	33,2 $\pm$ 1,9	32,3 $\pm$ 1,99

Система антиоксидантного захисту охоплює неферментативні антиоксиданти (наприклад, вітаміни, поліфеноли, флавоноїди, каротиноїди), зв'язувальні білки (наприклад, феритин, альбумін) і ферментативні антиоксиданти: глутатіонпероксидаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза і каталаза [81]. В наших дослідженнях проведено виявлення ферментативних антиоксидантів та динаміку їх активності при введенні препарату на основі ЕТС у кров корів, хворих на субклінічний мастит. Результати приведено в табл. 3.23.

Введення піддослідним тваринам ліпосомального препарату сприяло підвищенню рівня каталази. Різниця у її концентрації між дослідною та контрольною групами на початку експерименту була значною і сягала 15% ($P <$

0,05). Каталаза це фермент з дуже високою каталітичною активністю. Вірогідність отриманого відхилення може свідчити про наявність у корів дослідної групи запального процесу. Застосування ліпосомального препарату супроводжувалося збільшенням концентрації КАТ до рівня показника контрольної групи, а виявлене відхилення на сьому ($P < 0,01$) добу було статистично значимими. Потенційно схожі показники отримано для інших ферментативних антиоксидантів. Так, супероксиддисмутаза, концентрація якої у хворих корів була на досить низькому рівні з показником 19,6 од. акт./мл на початку лікування на сьому добу зросла на 23% ($P < 0,01$), що лише на 1,6 од. акт./мл нижче від показника контрольної групи. Однотипна ситуація спостерігалася для глутатіонпероксидази в плазмі крові з незначною розбіжністю концентрації у різні періоди після введення ліпосомального препарату.

Таблиця 3.23

Активність ензимів антиоксидантного захисту та вміст відновленого глутатіону у крові корів, $\bar{x} \pm SE$; $n = 5$

Показники	Групи тварин	Період дослідження		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба від лікування
Каталаза, одЕ/мл	К	2,31±0,16		
	Д	1,98±0,1*	2,11±0,1	2,28±0,1°
Супероксиддисмутаза, од.акт./мл	К	25,7±1,12		
	Д	19,6±1,12*	22,7±1,31*	24,1±1,29°
Глутатіонпероксидаза в плазмі крові, Нм GSH/хв на1 мг протеїну	К	24,0±1,08		
	Д	18,9±0,82*	21,8±1,13*	24,2±0,88°
Відновлений глутатіон в еритроцитах, мкМ/мл	К	0,554±0,016		
	Д	0,416±0,011**	0,426±0,012	0,445±0,013°

Незважаючи на невелику концентрацію для відновленого глутатіону виявлено не менш вагомів відхилення. Різниця між контрольною і дослідною групою на початку дослідження сягнула 31,7% ($P < 0,01$). Після застосування ліпосомального препарату рівень зростання ВГ в еритроцитах після введення лікувальної субстанції на сьому добу не перевищив 7%, але була достовірною ($P < 0,05$).

3.4.2. Вплив ліпосомального препарату на основі ЕТС на клітинний і гуморальний імунітет корів з субклінічним маститом

Умови дослідження клітинного та гуморального імунітету відповідають методиці, яку ми застосовували у розділі 3.4, для корів з катаральним маститом. Результати досліджень показано в таблицях 3.24 – 3.28.

Чисельність та функціональна активність Т-лімфоцитів (ТЕ-РУЛ) у периферичній крові корів наведені у табл. 3.24.

Таблиця 3.24

Відносна кількість загальних лімфоцитів ТЕ-РУЛ у крові корів (%),

$M \pm SE; n = 5$

Показники	Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з субклінічним маститом)		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
0	34,2±0,94	40,1±0,85***	38,2±0,64	37,8±0,61°*
3–5	51,1±0,78	46,6±0,77*	48,8±0,47	50,3±0,42°
6–10	12,9±0,71	11,9±0,78	12,1±0,44	11,5±0,31
М	1,81±0,12	1,48±0,15	0,93±0,08***	0,38±0,08°***
%	65,8±1,37	59,9±0,28*	61,8±0,62	62,2±0,56

Найбільше лімфоцитів, близько половини від загальної кількості, виявлено для групи з низькою щільністю ТЕ-РУЛ. Після введення препарату спостерігалось їх збільшення, відповідно, на третю добу на 2,2% і на сьому добу на 3,9% ($P < 0,05$) до значення близького до показника контрольної групи. Відповідно, зменшувалася різниця «нульових» та розеткоутворюючих Т-лімфоцитів високої щільності. Загалом спостерігалася наступна динаміка: для недиференційованих у функціональному відношенні клітин отримано незначне скорочення на 1,9 і 2,3%, відповідно, для третьої і сьомої доби експерименту; для середньоавідної субпопуляції зміни коливалися незначно в межах від 11,5 до 12,1%; у високоавідної групи зміни кількісного стану імунокомпетентних клітин були більш вираженими у корів на 7-й день після введення препарату. Тут спостерігалось значне відносне та статистично достовірне зменшення Т-

лімфоцитів відносно контрольної групи ($P < 0,001$), але зважаючи на низьку чисельність в межах 0,38 – 1,48% твердження про їх істотний вплив на стан імунітету корів хворих на з субклінічний мастит може бу помилковим. Загальна кількість розеткоутворюючих Т-лімфоцитів мала тенденцію до незначного зростання, але відносно контрольної групи їх чисельність була меншою на 3,6%. В табл.3.25 показано аналогічні показники для активних Т-лімфоцитів.

Таблиця 3.25

Відносна кількість ТА-РУЛ лімфоцитів у крові корів (%), $M \pm SE$; $n = 5$

Показники	Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з субклінічним маститом)		
		до лікування	3-тя доба лікування	7-ма доба лікування
0	$54,5 \pm 0,36$	$66,0 \pm 0,87^{***}$	$63,0 \pm 0,61^{\circ\circ}$	$60,4 \pm 0,79^{\circ}$
3–5	$36,0 \pm 0,27$	$28,9 \pm 0,42^{**}$	$30,1 \pm 0,35^{\circ}$	$32,4 \pm 0,52^{\circ*}$
6–10	$8,1 \pm 0,27$	$4,1 \pm 0,38$	$5,9 \pm 0,30$	$6,2 \pm 0,38$
M	$1,42 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,11$	$1,02 \pm 0,09$	$0,97 \pm 0,08$
%	$45,5 \pm 0,66$	$34,0 \pm 0,51^{***}$	$37,0 \pm 0,44^{**}$	$39,6 \pm 0,55^{\circ\circ*}$

На початку лікування кількість ТА-РУЛ(0) значно на 11,5% перевищувала їх чисельність у порівнянні з контрольною групою ($P < 0,001$). Дія ліпосомального препарату супроводжувалася поступовим зменшенням недиференційованих активних лімфоцитів в периферичній крові хворих корів: на 3% ($P < 0,01$) для третьої доби і 5,6% ($P < 0,05$) для сьомої доби лікування. Однак різниця між показниками контрольної та дослідної груп залишилася досить суттєвою. Серед розеткоутворюючих активних Т-лімфоцитів спостерігалось поступове зростання частки низько- і середньоавідних ТА-РУЛ, а лімфоцити групи M, які приєднали 10 і більше еритроцитів, знаходилися в межах 1%. Для малодиференційованих лімфоцитів ТА-РУЛ, які приєднали 3–5 еритроцитів, виявлені зміни на третю і сьому добу після введення лікувальної субстанції були статистично значимі на рівні $P < 0,01$. Таким чином можна констатувати, що процес лікування ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату має спрямований і вірогідний вплив на зростання в крові

хворих на субклінічний мастит корів розеткоутворюючих активних Т-лімфоцитів і протилежний вектор для ТА-РУЛ «нульової групи». В табл.3.26 показано результати виявлення Т-хелперів та Т-супресорів.

Таблиця 3.26

Відносна кількість хелперів (Th) та супресорів (Ts) у крові корів, (%),
 $M \pm SE; n = 5$

Показники		Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з субклінічним маститом)		
			до введення препарату	3-тя доба лікування	7-ма доба від початку лікування
Th	0	50,0±0,28	62,6±0,60***	55,0±0,52 ^{oo*}	53,1±0,52 ^{oo}
	3–5	41,9±0,28	32,4±0,34***	39,4±0,44 ^{oo}	43,0±0,39 ^{ooo}
	6–10	8,1±0,41	5,0±0,11***	5,6±0,17**	3,9±0,11 ^{***o}
	%	50,0±0,28	37,4±0,43***	45,0±0,58**	46,9±0,53 ^{***o}
Ts		16,7±0,46	14,2±0,53	14,7±0,56	16,2±0,63*
IPI		2,99	2,63	3,06	2,90

Введення коровам дослідної групи ліпосомального препарату супроводжувалося цілеспрямованим впливом на кількість теофілінрезистентних лімфоцитів у крові корів з субклінічним маститом. Встановлено стійкий спад кількості Th-РУЛ «нульової групи» лімфоцитів. На третю добу зменшення склало 7,6% ($P < 0,01$), на сьому 5,7% ($P < 0,01$). Одночасно чисельність частки «низькоавідних» Th-хелперів мала тенденцію до зростання. На третю добу експерименту її збільшення складало 7% ($P < 0,01$), на сьому 10,6% ($P < 0,001$). Стійкий ріст частки Th (3-5) і скорочення Th (0) відбулися за високого рівня достовірності. Зважаючи на те, що на долю Th-РУЛ (6-10) припадає лише 3,9 – 5,6% лімфоцитів і вони не мають вирішального впливу на розподіл Т-хелперів виявлену динаміку можна вважати наслідком лікувальної дії ліпосомальної субстанції.

Що стосується Т-супресорів, то введення ліпосомального препарату супроводжувалося поступовим збільшенням їх частки в периферичній крові хворих корів. Виявлене зростання склало на третю добу 3,5%, на сьому – 14,1%

($P < 0,05$) практично зрівнявшись на 7 добу з показником контрольної групи. Дане спостереження підтверджується величиною імунорегуляторного індексу, який при другому і третьому контролі знаходився в межах $IPi = 2,9 \div 3,06$, а в групі здорових корів $IPi = 2,99$. Необхідно констатувати, що застосування ліпосомального препарату вже на третій день лікування супроводжується вирівнюванням співвідношення між Т-хелперами та Т-супресорами до рівня, який було виявлено у контрольної групи, і яке підтримується далі. При відсутності переваги одного з видів супресорів йдеться про злагоджену роботу імунної системи. Таким чином, ліпосомальний препарат на основі ЕТС нівелює дисбаланс вироблення та гальмування антитіл, нормалізуючи роботу імунної системи до природного стану.

В табл. 3.27 показано результати визначення чисельності В-лімфоцитів. Отримані результати вказують на мінімальний вплив проведеного лікування на розподіл В-лімфоцитів у крові корів дослідної групи до та після введення препарату порівняно з контрольною. Збільшення кількості недиференційованих В-лімфоцитів склало лише 1,17% у дослідній групі відносно початку лікування і було однаковим на третій і сьомій добі після використання лікувального препарату.

Таблиця 3.27

Відносна кількість В-лімфоцитів у крові корів, (%), $M \pm SE$; $n = 5$

Показники	Контрольна група (здорові тварини)	Дослідна група (тварини з субклінічним маститом)		
		до введення препарату	3-тя доба лікування	7-ма доба від початку лікування
0	$58,4 \pm 0,61$	$59,7 \pm 0,61$	$60,4 \pm 0,56$	$60,4 \pm 0,53$
3–5	$37,0 \pm 0,31$	$33,8 \pm 0,37$	$34,2 \pm 0,41$	$34,6 \pm 0,11$
6–10	$4,6 \pm 0,11$	$6,5 \pm 0,11^*$	$5,4 \pm 0,11$	$5,0 \pm 0,1$
%	$41,6 \pm 0,49$	$40,3 \pm 0,54$	$39,6 \pm 0,32$	$39,6 \pm 0,33$

Серед розеткоутворюючих лімфоцитів більша частка належала низькоавідним ЕАС-РУЛ (3-5). Найбільше на 3,2% відхилення у цій групі було на початку лікування. Більш вагомими відмінностями характеризувалася

середньоавідна субпопуляція на першу добу дослідження (1,9%, $P < 0,05$).

Наявність взаємозв'язку між імунною системою й стрес-системами не тільки обумовлює її особисту участь в реакціях на шоківі ситуації, які викликаються іншими стресорами, але й визначає вагомість стресу на імунореактивність організму. В практичних дослідженнях, як найбільш інформативні маркери, найчастіше визначають особливості розподілу у сироватці крові показників бактерицидної та лізоцимної активності, а також циркулюючих імунних комплексів (табл. 3.28).

Таблиця 3.28

Показники гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму корів, $\bar{x} \pm SE$; $n = 5$

Показники	Групи тварин	Період дослідження		
		до введення препарату	3-тя доба після початку лікування	7-ма доба після початку лікування
Бактерицидна активність сироватки крові, %	К	49,0 $\pm$ 1,12		
	Д	39,8 $\pm$ 1,04**	48,5 $\pm$ 0,98	51,2 $\pm$ 1,12 ^{oo}
Лізоцимна активність сироватки крові, %	К	31,0 $\pm$ 0,77		
	Д	24,5 $\pm$ 0,86**	28,2 $\pm$ 0,92	35,5 $\pm$ 0,99 ^{ooo}
Циркулюючі імунні комплекси, ммоль/л	К	76,2 $\pm$ 0,77		
	Д	84,7 $\pm$ 1,13**	75,8 $\pm$ 0,91 ^{oo}	70,9 $\pm$ 1,12 ^{ooo}

Мінімальне значення БАСК для хворих на субклінічний мастит корів спостерігалось на першу добу дослідження. Відхилення відносно контрольної групи становило 9,2% ($P < 0,01$). Після введення препарату спостерігалось активне підвищення рівня бактерицидної активності. На сьому добу значення показника було дещо вищим ніж у здорових тварин але значно, на 11,4% ($P < 0,01$), перевищувало рівень виявлений на початку дослідження.

Типова картина спостерігалася для даних лізоцимної активності. Динаміка показників ЛАСК співпадає з описаною вище. Особливість отриманого результату полягала лише в тому, що на сьому добу різниця в показниках лізоцимної активності була статистично значимою відносно групи корів на початку досліду (11,0%; $P < 0,001$), але й відносно контрольної групи (3,5%; $P < 0,05$).

Відомо, що наявність ЦІК у крові допомагає позбутися антигенів, які виробляються організмом або потрапляють в нього зовні, а підвищення їхнього

рівня спостерігається під час запальних процесів.

У дослідженні встановлено, що максимальна кількість ЦІК спостерігалася на початковому етапі дослідження. Перевищення концентрації циркулюючих імунних комплексів відносно контрольної групи становило 11,2% ($P < 0,01$). Далі, спостерігалася різке зменшення вмісту ЦІК. На сьому добу від початку експерименту мали різницю між першою добою на 19,5% при максимальному рівні достовірності і 7,47% в порівнянні з контролем при $P < 0,05$.

Таким чином, на основі проведених експериментальних досліджень встановлено, що субклінічний мастит корів супроводжується змінами лейкоцитарного профілю крові, сприяє підвищенню продуктів перекисного окиснення ліпідів, показників окисної модифікації протеїнів та, загалом, знижує імунобіологічну реактивність організму.

Внутрішньом'язове введення тваринам досліджуваного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату сприяло стійкому зниженню інтенсивності окисних процесів, підвищенню антиоксидантного потенціалу, супроводжувалося інтенсивністю імунної відповіді.

Результати досліджень опубліковані в наступних наукових публікаціях:

Строяновська, Л. (2024). Біохімічний профіль крові у хворих на мастит корів за дії ліпосомального препарату. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка. Ветеринарні науки*. 1(42), 160–165. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2024-1.25>.

3.5. Зв'язок між алелями гена BoLA-DRB3 та кількістю соматичних клітин у молоці корів з субклінічним маститом

Соматичні клітини постійно присутні в молоці, а їх кількість вказує на порушення секреції молока або захворювання вим'я. Коров'яче молоко із здорової молочної залози має регулярний рівень КСК 100 – 150 тис. кл./мл. Вищі показники свідчать про секреторні порушення і захворювання. Значення КСК понад 500000 кл./см³ вказує на інфікування вим'я інфекційним агентом і свідчить про високу ймовірність запалення в одній або декількох чвертях молочної залози [202].

Генетична мінливість резистентності до маститу добре встановлена у молочної худоби. Багато досліджень були зосереджені на полігенних варіаціях ознаки шляхом оцінки спадковості та генетичної кореляції між фенотиповими ознаками, пов'язаними з маститом, такими як кількість соматичних клітин і клінічні випадки [211].

Серед генів, пов'язаних з хворобами ВРХ, особливе значення має ген BoLA-DRB3 через його особливу роль в імунній системі. Його продукти беруть пряму участь у зв'язуванні чужорідних антигенів і обумовлюють специфічність імунної відповіді. Він кодує β -ланцюг молекул класу II ГКГ, який бере участь у представленні антигену на антиген-презентуючих клітинах. Крім того, BoLA-DRB3 є найбільш поліморфним геном головного комплексу гістосумісності ВРХ, що допускає пошук маркерів (алелів DRB3.2) асоційованих з маститом [99, 153, 218, 235, 237].

В ряді наших робіт запропоновані методики, елементи яких можуть застосовуватися в програмах селекції для оздоровлення стад від будь-яких захворювань, які мають генетично-обумовлений зв'язок з ГКГ. Для виявлення асоціацій між BoLA-алелями та певною ознакою необхідно встановити силу зв'язку та статистичну значущість між частотами носіїв гена в альтернативних групах тварин [45, 237].

Дослідження проведено в ТОВ НВА «Перлина Поділля». Для виявлення маркерних алелів гена BoLA-DRB3 пов'язаних з високим і низьким рівнем соматичних клітин у молоці корів було сформовано дві групи тварин. У першу групу було включено 26 клінічно здорових корів з КСК ≤ 200000 з середнім показником чисельності соматичних клітин 142857 кл./см^3 . У другу групу залучено 60 голів з КСК $\geq 500000 \text{ кл./см}^3$, у яких було встановлено діагноз субклінічний мастит з середнім показником чисельності соматичних клітин 1062 тис. кл./см³. Далі формувалася загальна вибірка з 86 корів для виконання пошуку маркерів. На основі методу ПЛР-ПДРФ визначався алельний поліморфізм гена BoLA-DRB3, для чого у всіх корів відбиралися зразки крові.

В результаті виконаного дослідження отримано наступні результати (табл.3.29). За даними типування у загальній вибірці знайдено 20 алелів. Найбільш поширеним був алель BoLA-DRB3.2*24 з частотою виявлення у

19,3% Окрім нього ще сім алелів мали частоту прояву понад 5%: *22 – 9,66%; *16 – 7,95%; *07 і *28 по 7,39%; *10 – 6,82%; *23 – 5,68% і *08 – 5,11%. У вибірці з низьким вмістом соматичних клітин у молоці виявлено п'ять варіантів з $P(A) \geq 5\%$: *03, *07, *16, *24 і *28, а у вибірці з високим рівнем КСК мали аналогічні варіанти, що й для загальної групи корів.

Таблиця 3.29

Результати виявлення алелів BoLA-DRB3 асоційованих з КСК

Алелі BoLA-DRB3.2	Частота алелів у вибірках, $P(A)$			χ^2	Відносний ризик, RR	Тест $\chi^2_{\min}$ на обмежений розмір вибірки			
	загальна	низька КСК↓	висока КСК↑			$\frac{(a+b)(a+c)}{N}$	$\frac{(a+b)(a+c)}{N}$	$\frac{(a+b)(a+c)}{N}$	$\frac{(a+b)(a+c)}{N}$
*01	0,017	0,018	0,017	0,003	0,783	2,05	0,99	58,0	27,0
*03	0,046	0,054	0,042	0,131	0,758	5,45	2,73	54,5	25,5
*04	0,023	0,036	0,017	0,639	-2,23	2,73	1,27	57,3	26,7
*07	0,074	0,089	0,067	0,31	0,708	8,86	4,58	51,1	23,9
*08	0,051	0,036	0,058	0,426	1,72	6,14	3,38	53,9	25,1
*10	0,068	0,036	0,083	1,47	2,6	8,18	4,91	51,8	24,2
*12	0,017	0,036	0,008	1,74	-4,54	2,05	0,92	58,0	27,0
*13	0,034	0,036	0,033	0,007	0,929	4,09	2,05	55,9	26,1
*15	0,017	0,018	0,017	0,003	0,783	2,05	0,99	58,0	27,0
*16	0,08	0,071	0,083	0,081	1,2	9,55	5,41	50,5	23,5
*21	0,017	0,036	0,008	1,74	-3,74	2,05	0,92	58,0	27,0
22	0,097	0,018	0,133	6,53	9,82	11,6	8,31	48,4	22,6
*23	0,057	0,036	0,067	0,726	1,72	6,82	3,86	53,2	24,8
24	0,193	0,268	0,158	3,86	-2,49	23,2	12,4	36,8	17,2
*26	0,028	0,018	0,033	0,341	1,93	3,41	1,76	56,6	26,4
*28	0,074	0,089	0,067	0,31	0,71	8,86	4,58	51,1	23,9
*32	0,028	0,018	0,033	0,34	1,46	3,41	1,76	56,6	26,4
*36	0,023	0,018	0,025	0,09	1,42	2,73	1,36	57,3	26,7
*37	0,028	0,036	0,025	0,164	0,684	3,41	1,65	56,6	26,4
*48	0,028	0,036	0,025	0,164	0,645	3,41	1,65	56,6	26,4

Примітка. * $p \geq 0,95$

За величиною відносного ризику асоціації мали 6 алелів. Чотири з них

вказують на зв'язок з низьким КСК (*04, *12, *21 і *24, *48) і два – з високим рівнем соматичних клітин (*10 і *22).

За величиною RR серед асоціативних варіантів лише два алеля гена BoLA-DRB3*22 і 24* мали достовірно значимий зв'язок в системі «алелі BoLA-DRB3.2 – КСК», який підтверджувався критерієм χ^2 . Ці алелі також витримують перевірку на обмежений розмір вибірки (за тестом χ^2_{min}), що дає можливість рекомендувати їх у якості ДНК-маркерів. Серед інших варіантів не було алелів, які витримують перевірку за вказаними обмеженнями, крім частоти виявлення понад 5%.

Отже, у проведеному дослідженні виявлено два алеля гена BoLA-DRB3 з наступними характеристиками:

- вагома асоціація з низьким вмістом соматичних клітин: загальна вибірка алель BoLA-DRB3*24: $P(A) = 0,193$; $P \leq 0,05$; частота у вибірці з низьким КСК – 0,268, у вибірці з високим КСК – 0,158;

- вагома асоціація з високим вмістом соматичних клітин: загальна вибірка алель BoLA-DRB3*22: $P(A) = 0,097$; $P \leq 0,05$; частота у вибірці з низьким КСК – 0,018, у вибірці з високим КСК – 0,133.

У корів першої групи середній вміст соматичних клітин у корів, які мали алель *24 склав 129231 кл./см³, що на 10,5% менше ніж для вибірки з низьким КСК, в цілому. У корів другої групи середній вміст соматичних клітин у корів, які мали алель *22 склав 1295 тис. кл./см³, що 12,5% більше ніж середнє значення для вибірки з високим КСК.

Отже, в дослідженні виявлено достовірний зв'язок між двома алелями гена BoLA-DRB3 та низьким і високим рівнем соматичних клітин. Отримані результати вказують на генетичний зв'язок між алелями та маститами, тому що КСК безпосередньо залежить від стану вим'я. Зважаючи на це пропонується наступним чином використовувати виявлені асоціації.

Алель BoLA-DRB3.2*24, який має тісний генетичний зв'язок з низьким вмістом соматичних клітин у молоці корів, може бути використаний у селекційних програмах для формування дійного стада корів стійких до захворювань вим'я. Для цього необхідно проводити добір на основі інформації про наявність в генотипі бугаїв і теличок виявленого алеля.

Алель BoLA-DRB3.2*22, для якого встановлено вагому асоціацію з

високим вмістом соматичних клітин у молоці корів, може бути використаний у виробничих умовах. Корова з таким алелем в генотипі знаходиться в зоні підвищеного ризику щодо можливості захворювання на субклінічну форму маститу. Тому її утримання та ветеринарне обслуговування у постнатальному онтогенезі вимагають підвищеної уваги та відповідно додаткових витрат. У випадку низької молочної продуктивності така корова може вибраковуватися з молочного стада.

Результати досліджень опубліковані в наступних наукових публікаціях:

Suprovych, T.M., Suprovych, M.P., Mokhnachova, N.B., Biriukova, O.D., **Strojanovska, L.V.**, & Cherpurna, V.A. (2021). Genetic variability and biodiversity of Gray Ukrainian cattle by BoLA-DRB3 gene. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 12(1), 33–41. <https://doi.org/10.15421/022106>.

Строяновська, Л., & Супрович, Т. (2022). Встановлення зв'язку між соматичними клітинами молока і ДНК-маркерами у корів. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 102–103, 111–117. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.102.19>.

Строяновська Л.В., Супрович Т.М., Супрович М.П., Данчук О.В. Спосіб виявлення стійкості/схильності до маститу великої рогатої худоби у ранньому постнатальному онтогенезі : пат. на корисну модель 151429 Україна : заявл. 31.01.2022; опубл. 20.07.2022. Бюл. №29.

3.6. Терапевтична ефективність застосування препарату у формі ліпосомальної емульсії на основі етилтіосульфанілату коровам хворим на катаральний і субклінічний мастит

Ефективність лікування субклінічного і клінічних форм маститу корів залежить від вчасно поставленого діагнозу, ідентифікації збудників інфекції та визначення їх чутливості до антибактеріальних та протимаститних препаратів. Має значення комплексне лікування тварини з можливістю зупинити запалення однієї чверті. Для цього необхідно дотримуватися належного догляду за твариною, оскільки резистентність корів після захворювання відновлюється поступово. Одним з головних критеріїв ефективності проведеного лікування є відновлення продуктивності тварини та відсутності у молоці залишків

антибактеріальних препаратів. Терапевтичну ефективність лікування катаральної форми маститу корів нами було досліджено на 10 тваринах у фермерському господарстві «Подільська марка» Кам'янець-Подільського району та ТОВ НВА «Перлина Поділля» Шепетівського району Хмельницької області. Лікування корів проводили за допомогою ліпосомальної емульсії на основі етилтіосульфанілату дозою 0,04 мл/кг маси тіла тварини (з вмістом ЕТС 1,25%) тричі з інтервалом 24 години. Хворим тваринам змінили раціон годівлі – провели обмеження випоювання води, обмежили концентровані корма, в раціон включили сіно з злаково-бобових трав. Також, корови були переведені на ручне доїння, тваринам проводили масаж вим'я зверху донизу. За 5- 10 хвилин до доїння вводили 50 ОД дії окситоцину в/м.

Лікування тварин з субклінічним перебігом захворювання проводили на 10 коровах у ТОВ НВА «Перлина Поділля» Шепетівського району Хмельницької області (табл. 3.30).

Таблиця 3.30

Терапевтичний ефект при застосуванні ліпосомального препарату ЕТС

Групи тварин	Кількість, гол.	Одужало		Результати лікування
		голів	%	
Корови з катаральною формою маститу (Д ₁)	10	9	90	Протягом 3-5 діб загальний клінічний стан нормалізувався, набряклі частки вим'я зменшувалися в розмірах, а ущільнення, набряклість і болочість зникали.
Корови з субклінічним маститом (Д ₂)	10	10	100	Терапевтичний ефект через 48 год. КСК < 200 000 /см ³

Лише трьох ін'єкцій ліпосомального препарату на основі ЕТС вистачило для отримання позитивних результатів при лікуванні тварин з катаральним маститом. Вагомий терапевтичний ефект наступав через в середньому на 3 – 5 добу і становив 90%. Для лікування корів з субклінічним маститом достатньо було не більше двох ін'єкцій. Терапевтичний ефект наступав через 24-48 годин і становив 100%. Кількість соматичних клітин у молоці від корів з субклінічним маститом знижувалася до норми на 2 – 3 добу (в середньому 200 тис. кл./см³).

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зростання чисельності населення чинить значний тиск на продовольчі системи, що зумовлює необхідність збільшення виробництва продовольства та полегшення доступу до адекватного харчування. У вирішенні даної проблеми винятково важливою є роль молочної галузі. Молочний білок має не тільки вирішальне значення у покращенні харчування в глобальному вимірі, але й сприяє зміцненню здоров'я споживачів. У 2030 р. молочна галузь має забезпечити продукцією 8,6 млрд осіб населення. Очікується, що поточні тенденції зростання виробництва молока продовжаться, хоча і з можливим уповільненням. Це пов'язано зі скороченням поголів'я молочних тварин, розширенням міжнародної торгівлі та збільшенням споживання молока. При цьому, дефіцит молока залишатиметься й надалі. У прогнозі до 2050 року передбачається, що потреба у продуктах, які містять тваринний білок, подвоїться відносно з сучасним рівнем споживання [11, 22, 233].

В Україні, яка виробила в 2020 р. 9,3 млн тон молока та посіла 18 місце з 1% світового обсягу, протягом останніх 30 років його виробництво зменшується [22]. Загальна кількість ВРХ станом на 1 жовтня 2024 року становила 2294,4 тис. голів, у тому числі 1242,7 тис. корів. В промисловому секторі використовується 922,9 тис. голів ВРХ (близько 40%), з яких 375,9 тис. корови (<https://avm-ua.org/uk/post/v-ukraini-trivae-skorocenna-pogoliva-vrh>).

Перед виконанням експериментальної частини роботи проведено моніторингову оцінку поширення маститів корів у Хмельницькій області [46]. Виконаний аналіз показав, що рівень субклінічних маститів в товарних господарствах у 2023 році склав 28,9%. Необхідно відмітити позитивну динаміку щодо зменшення частки хворих тварин в порівнянні з 2021 роком на 2,8%. Відносно регіонів, де проводилися дослідження виявлено іншу динаміку. Так у Кам'янець-Подільському районі (Південний регіон), в якому розташоване ФГ «Подільська марка» у 2023 році спостерігалось значне підвищення захворюваністю маститами, яке склало 6,5% до попереднього року. У Шепетівському районі

(Північний регіон), де базуються сільськогосподарські угіддя і ферми ТОВ НВА «Перлина Поділля» виявлено мінімальний рівень захворюваності 13,3%, хоча у 2022 році відмічалось значне зростання патології молочної залози, яке в порівнянні з 2021 роком сягнуло 6,5%. Відносно середнього значення по області обидва регіони благополучні щодо поширення даного захворювання. Схожі результати приведено в інших дослідженнях, де стверджується, що на молочних фермах західного регіону України субклінічний мастит діагностується під час лактації у 29,4% корів, а клінічна форма виявляється у 4,6 разів менше ($P < 0,05$) [6, 38].

Аналіз захворюваності корів на мастит в дослідних господарствах показав, що у ТОВ НВА «Перлина Поділля» за останні три роки частка корів з субклінічною формою знаходилася на рівні 14,4 – 14,6%, а клінічні випадки мали тенденцію до зростання з 1,8 до 3,7%. Обидва показники знаходяться в межах середніх значень для Північного регіону. У ФГ «Подільська марка» позитивна тенденція зменшення маститів виявлена для обох форм захворювання: субклінічні форми з 13,6 до 11,8%, клінічні – від 3 до 1,8%. Це в 1,5 – 2 рази нижче від аналогічних показників для Південного регіону Хмельницької області.

Молоко та молочні продукти багаті високоякісними білками, мікроелементами, вітамінами, енергетичними жирами та іншими поживними речовинами і є ідеальним середовищем для росту різноманітних мікроорганізмів і зоонозних агентів. Свіжовидоєне молоко має природну антибактеріальну систему, яка проявляє бактерицидні властивості, але вони є короточасними, і тому ріст мікроорганізмів у необробленому стані неминучий. Низька мікробіологічна якість сирого молока в усьому світі зумовлена різними факторами, такими як стан здоров'я тварин, ступінь забруднення навколишнього середовища та умови зберігання [214].

Чисельна наукова та практична література стверджує, що мастит у молочних корів викликається великою різноманітністю збудників (табл.4.1). Серед них грампозитивні коки та грамнегативні палички є основними групами патогенних бактерій. Вони здатні продукувати різноманітні фактори вірулентності, які сприяють їх колонізації та інфікуванню тканини молочної залози. Маститні грампозитивні коки включають *Staphylococcus* spp. та *Streptococcus* spp., які виробляють фактори вірулентності, такі як екзотоксини,

ферменти та поверхневі білки, тоді як грамнегативні бацили, такі як *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae*, виробляють ліпополісахариди, носії заліза, екзотоксини та білки зовнішньої мембрани для підвищення їх патогенності. Кишкова паличка *K. Pneumoniae* та стрептококи навколишнього середовища (*Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae*) переважно живуть у коров'ячому гної, підстилці, підлозі хліву, гною тощо, і зазвичай проникають у вим'я через соскову протоку, коли корова лежить. Коагулазонегативні стафілококи (CNS) в основному зустрічаються в шкірі дійок і дійкових протоках корів і є переважно умовно-патогенними мікроорганізмами, які зазвичай викликають субклінічний мастит або легкий клінічний мастит [55, 87, 101, 147, 210, 217].

Таблиця 4.1

Бактеріальні ізоляти колекції культур збудників маститу [100]

Види бактерій	Кількість ізолятів	Види бактерій	Кількість ізолятів
<i>Corynebacterium</i> spp.	1349	<i>Staphylococcus hyicus</i>	120
<i>Escherichia coli</i>	496	<i>Staphylococcus</i> spp. (коагулазонегативний)	6929
<i>Enterobacter</i> spp.	58	<i>Streptococcus uberis</i>	561
<i>Klebsiella</i> spp.	194	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1
<i>Nocardia</i>	14	<i>Streptococcus canis</i>	3
Інші грамнегативні види	125	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	514
Інші грампозитивні види	105	<i>Streptococcus</i> spp.	1499
<i>Staphylococcus aureus</i>	4233	<i>Trueperella pyogenes</i>	137
Всього 16338			

Виконані нами бактеріологічні дослідження показали високу диференціацію ізолятів мікроорганізмів в сирому молоці. В мікробному профілі секрету вим'я в 40 пробах від корів з клінічним і субклінічним перебігом маститу було виявлено 85 ізолятів мікроорганізмів. При субклінічному маститі найбільше поширення, 57,6% із числа виділених нами ізолятів, мали грампозитивні коки. Ще 20% припадало на родину *Enterobacteriaceae*. Розповсюдження *Escherichia coli* серед них складало 12,9%. Домінуючими збудниками, як і очікувалось, були стафілококи – 34,1% і стрептококи – 23,6%.

Поширення *Streptococcus agalactiae* було дещо меншим. Його виявлено у 10,6% ізолятів, з яких половина була виокремлена як монокультура. Мастит відрізняється від більшості інших захворювань тварин поліетіологічністю, коли кілька різноманітних видів бактерій здатні вражати вим'я [63, 100, 249].

За клінічного маститу 41,2% виявлених патогенів належали до стафілококів, що майже вдвічі перевищувало стрептококові ізоляти. *Escherichia coli* і *Klebsiella pneumoniae* сумарно мали таку ж частку у мікробному профілі як і стрептококи (21,5%). В основному виявлялися асоціації патогенів (89,5%). Як монокультуру було виділено лише для одного виду мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*.

У Західному регіоні України найчастіше збудниками маститу були бактерії роду *Streptococcus* (47,7%) та *Staphylococcus* (45,5%), що вказує про їх головну етіологічну роль у виникненні субклінічного маститу. Серед коагулазопозитивних стафілококів за маститу домінував вид *S. aureus subsp. aureus*, який виділявся у 93,3% [6].

У відібраних 20 проб молока від корів з субклінічним маститом, нами було виявлено 34 епізоотичних штами мікроорганізмів. Половину у виявленому профілі становили бактерії з роду *Streptococcus* (26,5%) та *Staphylococcus* (23,5%). За даними роботи Куртяк та співавт. мікрофлора секрету вим'я від хворих на мастит корів представлена, як грампозитивними (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. uberis*), так і грамнегативними (*E. coli*, *P. aeruginosa*) мікроорганізмами та дріжджовими грибами (*Candida*). Найбільшу частку у загальному масиві виділених ізолятів становили культури *E. coli* (16,8%), *S. epidermidis* (15,7%) та *S. aureus* (12,5%) [16].

Відомо, що *Staphylococcus aureus* і *Streptococcus agalactiae* можуть виживати в тканинах молочної залози маститних корів протягом тривалого періоду, виділяючись з молоком і поширюючись на здорових корів через доїльну апаратуру, руки і рушники дояра, що сприяє їх поширенню [108, 243]. Ентеротоксигенні штами золотистого стафілококу за міжнародними стандартами віднесені до десятка особливо небезпечних бактерій, що виділяються з молока та молочних продуктів, а поява резистентного штаму *S. aureus* в молочних продуктах оцінюється як переважаючий фактор ризику для молочної галузі, який у деяких країнах перевищив поріг у 60% з тенденцією подальшого зростання [64, 150].

Виявлене поширення ізолятів є оригінальною характеристикою конкретного господарства і не повторюється на інших фермах. Але необхідно відмітити, що отриманий в нашому дослідженні мікробний пейзаж в основному відповідає показникам, які приводяться в наукових дослідженнях щодо розповсюдження маститів та їх збудників в Україні і регіоні, де виконувалися дослідження [6, 29, 30, 35, 38, 173].

Мастит є однією з основних причин використання антибіотиків у виробництві молочних продуктів. У звіті Національної системи моніторингу здоров'я тварин (США) зазначено, що приблизно 97% корів із клінічним маститом лікуються протимікробними препаратами [258]. Але застосування антибіотиків сприяє підвищенню антимікробної резистентності та стійкості збудників молочних продуктів до протимікробних препаратів, особливо тих штамів бактерій, які викликають мастит [98, 148, 160].

Виконана в роботі оцінка ефективності 23 антибіотиків на основні епізоотичні штами збудників маститу, що циркулюють у досліджених господарствах, показала, що *Staphylococcus aureus* виявилися стійкими до 8, а *Streptococcus agalactiae* до 19 препаратів, а у ампіциліну, нітрофурантоїну, неоміцину і цефтріаксону, зона росту була практично відсутня. Найкращі результати отримано при застосуванні бета-лактамних антибіотиків цефалоспоринового ряду – цефотаксиму і ципрофлоксацину. За повідомленням Національної системи моніторингу здоров'я тварин (NAHMS) майже три чверті молочних ферм в США застосовували цефалоспорини першого (34,4%) і третього покоління (38,6%) [122, 263].

Широке застосування антибіотиків в молочній галузі розпочалося після прийняття плану з 5 кроків Національно науково-дослідного інституту молочної промисловості (NIRD, Великобританія), першим з яких був: «Лікувати та записувати клінічні випадки». Національна рада з питань маститу (NMC) розширила його до десяти пунктів, а більшість країн внесли у програму доповнення, які враховують національні особливості молочного менеджменту, що привело до значних успіхів у боротьбі з маститами [143, 267]. Однак, безпосередньо через зниження надоїв і якості молока та опосередковано через збільшення витрат на його лікування дане захворювання продовжує залишатися

найпоширенішою та дорогою хворобою молочної худоби в усьому світі, а перший з п'яти пунктів залишається найбільш актуальним.

Проблеми антибіотикотерапії вимагають використання нових підходів у боротьбі з хворобами вим'я молочної худоби, які об'єднуються у відносно новий напрямок – неантибіотичне лікування маститу корів [138]. Серед нових ефективних терапевтичних засобів з широким спектром, ефективністю та швидкістю дії для оперативного лікування необхідно виділити ліпосомальні препарати.

Одним із потенційних шляхів ідентифікації ефективних біологічно активних сполук з метою створення нових субстанцій для лікарських та ветеринарних препаратів є цілеспрямований синтез. Цей підхід ґрунтується на фармакологічних властивостях раніше охарактеризованих природних активних речовин. Природні сульфінати та тіосульфати, виділені з рослин роду *Allium* є досить перспективними для практичного застосування. Однак їх використання стримується можливостями ресурсного забезпечення значних об'ємів вихідної сировини і деякими труднощами щодо виділення чистої субстанції.

Синтез структурних аналогів біологічно активних сполук природного походження є одним з відомих підходів, який дозволяє створювати нові ефективні препарати різного призначення. ЕТС – це синтезований аналог природних тіосульфатів, кількість і якість яких залежить тільки від постановки реакції синтезу [179, 190]. Вони, як і природні аналоги характеризується антибактеріальною, протигрибковою, противірусною, антипаразитарною, протизапальною, антитромботичною, антигіпертензивною, антиоксидантною, антиатеросклеротичною та антиканцерогенною дією на збудників хвороб, а безпечність синтетичних аналогів дозволяє запропонувати етилтіосульфанілат у складі ліпосомального препарату як перспективний засіб для лікування молочної залози корів [166, 183, 236, 268].

Основне завдання роботи полягало у дослідженні ефективності нової ліпосомальної субстанції на основі етилтіосульфанілату при лікуванні маститу корів. Для цього, за результатами експерименту терапевтичного використання

ліпосомального препарату виконано аналіз імунобіологічних та біохімічних змін у крові корів хворих на катаральний та субклінічний мастит. В аналізі використано порівняння даних для обох варіантів захворювання за величиною, напрямком змін показника (збільшення/зменшення) та їх вірогідністю.

В проведених дослідженнях у периферичній крові корів хворих на мастит виявлено певні коливання показників, як за катарального (*дослід 1*) так і субклінічного (*дослід 2*) запалення молочної залози. По відношенню до групи здорових тварин на початковому етапі виявлено наступні відхилення: зниження гемоглобіну: *дослід 1* – 8,4 г/л або 8,96% ($P < 0,05$), *дослід 2* – 4,2 г/л або 4,37% ($P < 0,05$); зменшення еритроцитів: *дослід 1* – $0,47 \cdot 10^{12}/\text{л}$ або 7,78% ($P < 0,05$), *дослід 2* – $0,36 \cdot 10^{12}/\text{л}$ або 6,11%; збільшення лейкоцитів: *дослід 1* – $3,98 \cdot 10^9/\text{л}$ або 52,9% ($P < 0,001$), *дослід 2* – $2,99 \cdot 10^9/\text{л}$ або 37,8%. Після застосування препарату відбувається зсув показників в позитивному напрямку. Найбільше відхилення виявлено для вмісту лейкоцитів, кількість яких зросла на $1,94 \cdot 10^9/\text{л}$ або 20,3% ($P < 0,05$) за клінічній формі та $1,88 \cdot 10^9/\text{л}$ або 35,9% ($P < 0,01$) за субклінічного маститу. Для гемоглобіну і еритроцитів динаміка не перевищує 6–11%, із вірогідністю прояву лише на сьому добу дослідження.

При впливі захворювання, як фактору стресу, в стадії мобілізації загального адаптаційного синдрому наступають характерні зміни в кровотвірній системі (за Сельє): периферична кров – значний нейтрофіліоз, лімфопенія й еозінопенія; кістковий мозок – лімфоїдний пік і зменшення вмісту зрілих гранулоцитів; лімфоїдні органи – зменшення кількості (виснаження) клітин. Зменшення кількості зрілих гранулоцитів у кістковому мозку та клітин у лімфоїдних органах пов'язане з тим, що ці клітини швидко вивільняються в кров. Це відбувається через стрес, який змушує кістковий мозок, селезінку і тимус вивільняти їх значно більшій кількості. Цей процес головним чином відповідає за поповнення клітинного складу периферичної крові, що спостерігається в періоди стресу, включаючи периферичну нейтрофілію. У наступній фазі резистентності ініціюється процес гіперплазії кісткомозкового кровотворення. Це характеризується збільшенням кількості бластних форм гранулоцитарного ряду в кістковому мозку, що є компенсаторною

реакцією на стимуляцію гранулоцитопоезу. Продовження впливу стресу згодом призводить до настання стадії виснаження. [1].

Схожі результати при застосуванні ліпосомальних препаратів для лікування маститу корів отримано в іншому дослідженні. В роботі Чепурної та інш. показано, що субклінічний запальний процес молочної залози призводить до вірогідного збільшення кількості лейкоцитів ($P < 0,01$), та гемоглобіну ($P < 0,05$), а кількість еритроцитів у крові хворих тварин у порівнянні зі здоровими знизилася на 8%. Проведене триразове інтрацистернальне введення хворим коровам в уражені чверті молочної залози ліпосомального препарату «Ліманін» спричинило зменшення ($P < 0,05$) загальної кількості лейкоцитів, особливо на 9-ту добу, що свідчить про згасання запального процесу [51].

Вміст загального білку в сироватці крові ВРХ вважається одним із важливих показників клінічного стану тварини та її резистентності. При захворюваннях його рівень може відхилятися від значень нормального діапазону 67–75 г/л. З врахуванням референтних відхилень [107] для розрахункових значень стандартної похибки у першому досліді маємо межі від 67,3 до 76,8 г/л, у другому досліді від 66,2 до 77,9 г/л (<https://www-users.york.ac.uk/~mb55/intro/refint.htm>). В нашій роботі рівень протеїну в дослідних групах мінімально перевищував лише верхню межу. У групах хворих корів отримано дещо нижчі результати, які перебували ближче до нижньої межі, але в межах гомеостатичної норми. Після застосування ліпосомального препарату на основі ЕТС спостерігається стабільний приріст протеїнової фракції.

Схожа ситуація описана в дослідженні ліпосомального препарату на основі екстракту з плодів *Silybum marianum* для лікування патологій печінки. Кількість альбумінів у сироватці крові корів при лікуванні зросла порівняно з показниками до ін'єкції, хоча їхній рівень не відповідав клінічно здоровим коровам [255].

Як правило, гіперпротеїнемія полягає в порушенні білкового обміну, незбалансованості процесів синтезу та розпаду білків і досить часто пов'язується з наявністю запальних процесів. Його зростання в основному відбувається за рахунок глобулінів, які забезпечують імунну відповідь при різних захворюваннях,

а зниження пояснюється недостатнім синтезом або надлишковою втратою, руйнуванням альбумінів та виснаженням їх запасів. Зміни активності ферментів білкового обміну характеризуються специфічними особливостями, які не завжди співпадають з модифікаціями інших його показників, в тому числі й загального вмісту протеїну. [145, 231]. Тому отриманий нами результат без ретельного дослідження фракцій білків дає змогу досить обережно стверджувати про позитивний вплив лікувального препарату на процеси протеїнового обміну.

Необхідну інформацію про стан імунної системи корови отримують за показниками кількості формених елементів крові, серед яких основна роль належить лейкоцитам, які є частиною імунної системи організму. Вони руйнують і видаляють старі або аберантні клітини та клітинні залишки, а також атакують патогени та сторонні речовини, а за наявності захворювання і відповідного лікування лейкоцитарний фон буде характеризувати вплив лікарських препаратів на імунобіологічну реактивність організму. Це повністю стосується використання любого лікування, в тому числі з використанням ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату.

У периферичній крові виділяють 5 субпопуляцій лейкоцитів, частка яких може сильно коливатися в залежності від інтенсивності запального процесу. Крім того, розбіжності в біохімічному складі крові серед різних популяцій ВРХ залежать від таких чинників, як умови утримання, режим харчування, вік, фізіологічний стан тварин, а також їх генотип і походження [15, 50].

Запальний процес молочної залози є складною реакцією організму, яка виникає у відповідь на дію патогенів. Зміни гомеостазу при гострих і хронічних захворюваннях, в першу чергу, впливають на показники крові, які найбільш точно відображають зміни в організмі тварини. В наших дослідженнях в контрольних групах кількість лімфоцитів була в межах фізіологічної норми: для корів з клінічним маститом 57,1% і субклінічним – 58,6%. У хворих тварин на початку досліджу спостерігалось суттєве відхилення від норми в сторону зменшення частки лімфоцитів на 10,1% ($P < 0,05$) та 6,3%, відповідно. Диспропорція між показниками у здорових і хворих корів може бути значно більшою і сягати 17,5% при клінічних

та 10,2% субклінічних формах захворювання [19].

Інші складові лейкограми характеризувалися більшими частками у групах хворих корів в порівнянні із здоровими тваринами. За катаральною формою статистично значимі відхилення відносно контрольної групи виявлено для еозинофілів (1,46%; $P < 0,05$), моноцитів (0,78%; $P < 0,05$) і паличкоядерних нейтрофілів, рівень яких був у 2,65 ($P < 0,001$) разів вищим у хворих корів. За субклінічного перебігу захворювання аналогічні, але статистично не значимі відхилення, за виключенням моноцитів (1,97%; $P < 0,01$).

Підвищення концентрації еозинофілів у крові корів зумовлюється сенсibilізуючими властивостями патогенів, особливо стафілококів, а збільшення моноцитів при субклінічному маститі може бути способом компенсації організмом нестачі нейтрофільних гранулоцитів, необхідних для фагоцитозу інфекційних агентів. При клінічній формі кількість моноцитів зменшувалася, що вказує на більш важкий перебіг хвороби та зниження захисних сил організму.

Отримана картина розподілу складових лейкоцитарного профілю підтверджує, що у дослідну групу було долучено хворих корів, а значне перевищення паличкоядерних нейтрофілів при катаральній формі захворювання свідчить про наявність гострого інфекційного захворювання (зсув ліворуч при важких формах запалення).

Після введення препарату на основі ЕТС для більшості її складових спостерігається позитивна динаміка щодо нормалізації лейкограми до стандартних показників за обох форм перебігу захворювання. Необхідно відмітити відновлення лімфоцитів до рівня контрольної групи. При цьому даний процес при однаковій кількості застосованої ліпосомальної субстанції у корів з клінічним маститом протікав у двічі швидше (оцінено за зміною частки приросту лімфоцитів на третю і сьому добу лікування) і був вірогідним для обох дослідів.

Серед очікуваної динаміки показників лейкограми після ін'єкцій препарату щодо відновлення спрямованого на зближення з даними контрольної групи виявлено відхилення: при клінічній формі для еозинофілів і сегментоядерних нейтрофілів, між початком і третьою, а базофілів між третьою і сьомою добою

досліді; при субклінічній формі для паличкоядерних нейтрофілів на третю добу і практичну відсутність змін для базофілів, еозинофілів та сегментоядерних нейтрофілів між третьою і сьомою добою досліді.

Зміни в лейкограмі включають лейкопенію, нейтропенію, дегенеративний зсув вліво та нейтрофілію з токсичними змінами. Тому при їх аналізі, особливо для випадків гострого перебігу захворювання, необхідно уявляти стадії лейкопоезу, який включає проліферацію, дозрівання та зберігання лейкоцитів. На проліферативний пул припадає приблизно 10–30%, а на пули дозрівання та зберігання – 65–90% гранулоцитів у кістковому мозку. При інтерпретації лейкограми ВРХ слід враховувати, що відповідь кісткового мозку є повільнішою із збільшенням потреби в нейтрофілах, а пул зберігання гранулоцитів менший порівняно з іншими видами формених елементів лейкоцитарного профілю [62, 68, 244].

Щоб з'ясувати, наскільки сильно впливає ендогенна інтоксикація на організм, визначають рівень продуктів перекисного окислення ліпідів. ПОЛ надскладний процес, що відбувається в клітинах і тканинах під впливом АФО, який призводить до пошкодження клітинних мембран та інших структур з високою ймовірністю серйозних наслідків для здоров'я тварин.

Оксидативний стрес виникає внаслідок дисбалансу АФО, включно з вільними радикалами, і здатністю організму до їхньої нейтралізації за допомогою антиоксидантних систем. Його дія призводить до пошкодження клітин і тканин організму, що може сприяти розвитку різних захворювань і патологічних станів. Зазвичай організм короткочасно реагує на стрес підвищенням рівня ПОЛ, що пояснюється здатністю організму адаптуватися до екстремальних умов. У таких випадках активні форми Оксигену функціонують як вторинні месенджери, сприяючи передачі сигналів і активації факторів транскрипції та відповідних генів, зокрема тих, що кодують антиоксидантні ензими. Як вторинні месенджери, АФО беруть участь у клітинному метаболізмі. Вони сприяють передачі регуляторних сигналів від міжклітинних сигнальних молекул та їх мембранних рецепторів до внутрішньоклітинних регуляторних систем, які контролюють експресію генів [12].

Встановлено, що будь-який достатньо потужний вплив на організм може ініціювати процеси перекисного окислення ліпідів. ПОЛ ініціює, відповідно, створення таких проміжних і кінцевих складових, як гідроперекиси ліпідів і ТБК-активні продукти. В нашій роботі у плазмі крові хворих корів 1 і 2 досліді до введення ліпосомального препарату виявлено збільшення кількості ГПЛ і концентрації ТБК-активних продуктів відносно контролю. При субклінічній формі маститу відхилення були значні та статистично значимі: ГПЛ – 38,5% ($P < 0,01$); ТБК-активні продукти – 27,1% ($P < 0,01$). Після ін'єкцій лікувальної форми наступала стійка динаміка зменшення кількості обох компонентів, яку для ТБК-активних продуктів можна оцінити, як помірну, а для ГПЛ, як інтенсивну. Ми вважаємо, що для нормалізації рівня гідроперекисів ліпідів при лікуванні ЕТС, який проявляє високий інгібуючий вплив на інтенсивність проміжних продуктів ПОЛ, достатньо одноразового введення препарату.

Схожі експериментальні показники для субклінічного маститу показано в дослідженні іншого ліпосомального препарату. Захворювання також впливає на підвищення у хворих корів вмісту ТБК-активних продуктів і ГПЛ. До введення препарату рівень ТБК-активних продуктів був на 26,6% ($P < 0,01$), а гідроперекисів ліпідів – на 32,9 % ($P < 0,001$) більшим, ніж у тварин контрольної групи. На 9 добу після введення лікувальної субстанції спостерігалось достовірне зниження вмісту ТБК-активних продуктів (7,17% проти 8,62 %, $P < 0,01$) і гідроперекисів ліпідів (1,42% проти 1,82%, $P < 0,01$), у порівнянні з показниками, визначеними до лікування [52].

Порушення збалансованості між інтенсивністю ОМП, процесом поступового їх розщеплення від самого початку синтезу білків вважається одним із важливих маркерів пошкодження тканин. При патологічних станах першочергово білки окислюються АФО, а не ліпіди чи нуклеїнові кислоти. Тому саме показник ОМП виділяється, як один із перших і найбільш надійних індикаторів ураження тканин при вільнорадикальній патології. Найбільших успіхів досягнуто при вивченні варіанту ОМП пов'язаного з утворенням карбонільних похідних в результаті окислення амінокислотних залишків всередині поліпептидного ланцюга.

Окиснення залишків лізину, аргініну, гістидину, проліну призводить до формування альдегідних або кетонових похідних. Альдегідні похідні прийнято вважати ранніми, а кетонові – пізніми маркерами окиснення білків [123, 194].

Визначені в дослідженні показники для альдегідних (ОМП₃₇₀) та кетонових (ОМП₄₃₀) похідних окисної модифікації протеїнів після застосування ліпосомальної субстанції повністю співпадають за напрямком і динамікою змін з ТБК-активних продуктів і ГПЛ. Зменшення ОМП становило від 4,1 до 9,1 нмоль/мг білка для корів з клінічною формою і від 2,8 до 5,1 нмоль/мг для корів з субклінічною формою перебігу захворювання. Схожі дані виявлено в дослідженні впливу ліпосомального препарату «Ліманін» [252]. Таким чином, застосування ЕТС гасить розвиток окисно-карбонільного стресу.

Антиоксидантна система захисту запобігає пероксидному пошкодженню клітинних структур. Вона регулює окисну деградацію ліпідів під дією вільних радикалів. Пероксидація ліпідів у мембранах, контролює вміст активних форм Оксигену, вільних радикалів і кінцевих продуктів обміну речовин. Реактивні форми Оксигену за умов фізіологічного гомеостазу ефективно нейтралізуються механізмами САЗ. Серед антиоксидантів виділяють ензиматичні (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, гемоксидаза-1, редокс-протеїни) та неензиматичні (аскорбінова кислота, токоферол, каротиноїди, глутатіон, Селен) варіанти [106, 197].

Лікування препаратом на основі ЕТС сприяло зниженню інтенсивності процесів окиснення і зростанню активації механізмів САЗ. Встановлені нами показники для ензимів антиоксидантного захисту каталази, супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази продемонстрували стабільну односторонню динаміку з високою достовірністю на 7 добу експерименту ($P < 0,01$) для корів обох форм маститів. Така ж динаміка в обох дослідках виявлена для метаболіту ВГ в еритроцитах ($P < 0,05$).

Гемопротеїн каталаза каталізує реакцію розкладання перекису Гідрогену на воду і молекулярний Оксиген. Її біологічна роль полягає в деградації перекису, що утворюється в клітинах в результаті дисмутації супероксиду і забезпеченні

ефективного захисту клітинних структур від руйнування під його дією. Каталаза – це фермент, який працює дуже ефективно. Йому не потрібна енергія активації, щоб ініціювати початки роботи [253]. Супероксиддисмутаза, антиоксидантний фермент, що виробляється всіма клітинами організму, функціонує для пом'якшення потенційного шкідливого впливу вільних радикалів Оксигену на клітини. Вільні радикали, які є побічними продуктами нормальних метаболічних процесів, потенційно можуть порушувати цілісність і функції клітин. Регуляція активності супероксиддисмутази здійснюється редокс-системою клітини, обумовлюється інтенсивністю утворення радикалів і залежить від концентрації продуктів ПОЛ у клітині [39]. Високий ступінь окиснення характеризується зниженням протеолізу протеїнів через утворення міжмолекулярних зшивок, зменшення розчинності та агрегацію. Утворені агрегати накопичуються у клітинах у вигляді агресом. Інтенсивність деградації окиснених білків є важливою функцією внутрішньоклітинної протеолітичної системи, а нездатність до їх руйнування пов'язана з різними патологіями та процесами старіння [12].

Як зазначалося, глутатіонпероксидаза позиціонується як один з ключових ферментів САЗ, основною функцією якого є руйнування та інактивація перекису Гідрогену та токсичних сполук Оксигену. До складу ферменту входить кофактор Селен. Перекис Гідрогену та активні радикали утворюються в результаті процесів ПОЛ, що супроводжується дестабілізацією клітинних мембран аж до руйнування. Саме ГП забезпечує захист мембран клітин від руйнівної дії потужних окисників. Кінцевою лінією захисту організму від пошкоджувальної дії пероксиду Гідрогену й органічних гідропероксидів є глутатіоновий редокс-цикл, що включає ГП, а також метаболіт – відновлений глутатіон, які нерозривно пов'язані між собою і в комплексі здатні інгібувати вільнорадикальне окиснення [106].

ЕТС не лише гальмує пероксидні процеси у клітинах, а й індукує експресію генів, які кодують ензими САЗ. Важливими внутрішньоклітинними цілями таких сполук є редокс-чутливі транскрипційні фактори, зокрема антиоксидант-адаптивні елементи. Реалізація цитопротекторних ефектів естерів тіосульфокислот може здійснюватися через модуляцію ARE-регульованої

експресії цих генів [252]. Тому отримані дані цілком підтверджують антиоксидантну дію складових ліпосомального ЕТС препарату.

Наукові дослідження показують, що у патогенезі маститів провідне значення мають механізми, які реалізуються через гуморальний та клітинний імунітет, з наступним формуванням гіперчутливості миттєвого та сповільненого типу, імунологічної реактивності до власних тканин, розвитком вторинного імунодефіциту, зниженням неспецифічної резистентності [34, 59, 79, 162, 199].

Ліпосомальні препарати можуть ефективно використовуватися для доставки в молочну залозу необхідної лікувальної субстанції з метою корекції імунного гомеостазу при інфекційно-алергічних захворюваннях [21, 33, 58].

Більшість інфекцій при нормальному функціонуванні імунної системи має короткотривалий перебіг без негативних наслідків. Організм володіє значним арсеналом факторів резистентності проти інфекцій. Реалізуються механізми імунної відповіді, а саме: розпізнавання збудника та спрямовану відповідь на його знешкодження. Імунна система ссавців є саморегульованою. Гени імунного розпізнавання кодують синтез білків і активність лімфоїдних клітин, що допомагає утримувати ці білки під контролем при захворюваннях [14]. Природний імунітет характеризується швидким початком, працює ефективно та незалежно від клональної проліферації антиген-специфічних клітин, що є відмінною особливістю адаптивного імунітету [7, 185].

Лімфоцити відповідають за визнання чужорідних антигенів та участі у імунній відповіді організму. Їхня диференціація визначається вмістом субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів у периферичній крові корів [113].

За кількістю еритроцитів, адсорбованих одним лімфоцитом, судять про ступінь їх активності. У відібраних нами зразках крові частка «нульових», тобто таких що не приєднали жодного еритроциту для ТЕ-РУЛ, ТА-РУЛ і Т-теофілінрезистентних Th-РУЛ, була вищою в групі хворих тварин і сумарно нижчою для розеткоутворюючих лімфоцитів у порівнянні з контролем. Подібне співвідношення було характерним для крові корів з обома формами маститу. Різниця стосувалася лише величини часток та вірогідності виявлених відхилень.

Для «авідних» форм основні зміни стосувалися лімфоцитів з низькою щільністю. Серед загальних лімфоцитів їхня частка сягала майже половини і перевищувала сумарний рівень середньоавідної та високодиференційованої субпопуляцій ТЕ-РУЛ в 3,69 разів для контрольної вибірки у першому досліді та 3,73 рази в другому досліді. Для групи тварин з клінічним маститом максимальне відхилення у 4,6 рази спостерігалось на 3 добу, а для групи з субклінічною формою у 4,21 рази – на 7 добу після введення препарату. Для активних лімфоцитів частка малодиференційованих ТА-РУЛ складала близько 30% від усіх виявлених. Їхнє співвідношення до загальної частки середньо- та високоавідних субпопуляцій в контрольній групі у першому досліді було як 3,98:1, а в другому досліді – як 3,78:1. Близько третини становила частка хелперів Th(3-5). В зв'язку з явним переважанням теофілінрезистентних Th-РУЛ(0) і відсутністю високоавідної субпопуляції М-лімфоцитів співвідношення до Th-РУЛ(6-10) в контрольній групі у крові корів з клінічним маститом було значно вищим, ніж у ТЕ-РУЛ та ТА-РУЛ і оцінювалось як 5,21:1. У крові корів з субклінічним перебігом захворювання маститом пропорція була 4,44:1.

Після внутрішньом'язевого введення лікувального ліпосомального препарату з ЕТС спостерігається зменшення «нульових» ТЕ-РУЛ, ТА-РУЛ і Th-РУЛ за обох форм захворювання. У першому досліді виявлено скорочення від 1,7% (ТА-РУЛ) до 3,9% (ТЕ-РУЛ) ($P < 0,05$), а в другому – більш інтенсивний процес впливу препарату на зменшення лімфоцитів від 2,3% (ТЕ-РУЛ) до 9,5% (Th-РУЛ) ($P < 0,01$). Одночасно відбувалося незначне збільшення частки Т-супресорів на 2,2% у першому досліді та на 2% – у другому.

Відомо, що В-лімфоцити здійснюють специфічну гуморальну імунну відповідь. Серед них явне переважання належить недиференційованим В-лімфоцитам: для корів з катаральною формою маститу їх частка становила 60% до застосування ліпосомального препарату, за субклінічного маститу – 62,6%.

Після застосування лікувальної субстанції частка активних В-лімфоцитів (з низькою і середньою авідністю) у першому досліді мала зростання на 2,7% ($P < 0,05$) на сьому добу експерименту. При субклінічній формі у другому і третьому

зразках крові виявлено мінімальне зменшення розеткоутворюючих ЕАС-РУЛ лише на 0,7%.

Серед гуморальних факторів природної резистентності, які відповідають за стрес і резистентність організму, в дослідженнях перш за все вивчають наявність у сироватці крові бактерицидної та лізоцимної активності, а також циркулюючих імунних комплексів. За результатами дослідження встановлено, що бактерицидна та лізоцимна активність, була значно меншою відносно контрольної групи тварин по відношенню до дослідної вибірки на початку експерименту. Виявлені відхилення були статистично значимими ($P < 0,01$) для обох форм маститу. Після лікування ліпосомальною ЕТС субстанцією встановлено інтенсивне зростання бактерицидної на 9% ($P < 0,01$) та лізоцимної активності на 6,2% ($P < 0,01$) на 7 добу для зразків крові взятих у корів з катаральним маститом. У другому досліді ріст показників був більш вагомим і становив 11,4% ($P < 0,01$) та 11% ($P < 0,001$).

Відомо, що циркулюючі імунні комплекси це гетерогенна група імунореактивних, утворених нековалентним з'єднанням типу антиген-антитіло. Надлишкова кількість антигену, утворення зайвих імунних комплексів без їх ефективної елімінації, сприяє розвитку хвороби імунних комплексів (гіперчутливість III типу). Накопичення дрібних імунних комплексів в різних органах і тканинах, може викликати запальний процес і пошкодження біологічних структур [58, 207].

У дослідженні встановлено, що кількість ЦІК у сироватці крові під дією ліпосомального препарату зменшилася. Виявлені відхилення характеризуються високою вірогідністю. Показники у корів дослідної групи з клінічним маститом зменшилися на третю добу на 17% ($P < 0,01$) і сьому добу експерименту додатково ще на 5% ($P < 0,001$). Висока ефективність ліпосомального препарату вже на третю добу дозволила знизити показник ЦІК до рівня, який перевершив дані контрольної вибірки. У другому досліді на сьому добу зменшення вмісту ЦІК склало 19,5% ($P < 0,001$) і було меншим від показника контрольної групи на 5,3%. В дослідженні Левківської повідомляється, що при субклінічному маститі рівень ЦІК зростає переважно за рахунок найбільш патогенних середніх

імунних комплексів. Їх кількість перевищувала показники у здорових тварин в 11,7 рази, тоді як дрібних ЦК було більше у лише на 10% [20].

Таким чином, за результатами дослідження встановлено, що катаральний і субклінічний мастит супроводжується нейтрофільним лейкоцитозом і вираженою лімфопенією, інтенсифікацією процесів пероксидного окиснення ліпідів та накопиченням продуктів ПОЛ і ОМП, зниженням активності гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму та популяції імунокомпетентних клітин і збільшенням рівня ЦК, як показника запальних процесів організму. Введення ліпосомального препарату на основі ЕТС супроводжувалось позитивним впливом на гематологічні показники крові хворих тварин, нормалізацією окисних процесів, що призвело до зниження вмісту кінцевих та проміжних продуктів ПОЛ, до зменшення рівня бактерицидної та лізоцимної активності та сприяло зростанню кількості Т- і В - лімфоцитів.

Аналіз та оцінка динаміки встановлених результатів вказує на позитивний вплив ліпосомальної субстанції на основі етилтіосульфанілату на перебіг захворювання, що зумовлює можливість його застосування при лікуванні корів з катаральною і субклінічною формами маститу.

Сучасна селекція, спрямована на створення молочних стад резистентних до захворювань, все частіше опирається на пошук зв'язку між хворобами та генетичними маркерами, які ідентифікують окремі гени, ділянки ДНК, РНК або хромосом за допомогою притаманної лише їм послідовності нуклеотидів. Переважна кількість сучасних маркерів пов'язані зі структурою ДНК (так звані ДНК-маркери). Це дозволяє досліджувати генетичний поліморфізм на рівні геному, а не продуктів експресії гена [47, 49, 85, 89, 91].

Для виявлення генетичних маркерів для КСК вивчено поліморфізм другого екзону гена BoLA-DRB3 методом ПЛР-ПДРФ. Відомо, що цей ген відіграє особливу роль в імунній системі, бо його продукти визначають специфічність імунної відповіді і беруть пряму участь у зв'язуванні чужорідних антигенів.

Для 86 корів (26 корів з КСК ≤ 200000 і 60 голів з КСК ≥ 500000 кл./см³) за даними типування знайдено 20 алелів. Найбільш поширеним виявився алель

BoLA-DRB3.2*24 (19,3%). Після відсіювання алелів за величинами відносного ризику і χ^2 та після перевірки на обмежений розмір вибірки в системі «алелі BoLA-DRB3.2 – КСК» виявлено два варіанти з наступними характеристиками:

– вагома асоціація з низьким вмістом соматичних клітин: алель BoLA-DRB3.24: $P(A) = 0,193$; $P \leq 0,05$;

– вагома асоціація з високим вмістом соматичних клітин: алель BoLA-DRB3.22: $P(A) = 0,097$; $P \leq 0,05$.

У корів першої групи корів, які мали алель *24, середній показник КСК склав 129231 кл./см³, що на 10,5% менше ніж для вибірки з низьким КСК. У корів другої групи середній вміст соматичних клітин у корів, які мали алель *22 склав 1295 тис. кл./см³, що 12,5% більше ніж середнє значення для вибірки загалом.

Головною метою практичної ветеринарної медицини є виявлення патологічного процесу на найбільш ранніх стадіях онтогенезу. У зв'язку з недостатнім вивченням необхідно звернути увагу на наступні стани та процеси: інволюція-еволюція молочної залози; дистрофія, прискорений апоптоз та лущення альвеолярних епітеліоцитів вим'я; зниження активності та дистрофія кількості плазмоцитів, що призводить до мастопатії та значного зростання КСК. Ці процеси займають провідне місце у виникненні дефіциту колостральних імуноглобулінів, а мастодистрофія має лише два безальтернативних варіанти розвитку: при ефективному лікуванні процес призупиняється та настає репаративна регенерація, а без належного втручання у перебіг захворювання розвиваються субклінічні і з часом клінічні форми маститу [14].

Встановлений достовірний зв'язок між двома алелями гена BoLA-DRB3 та низьким і високим рівнем соматичних клітин дозволяє в постнатальному онтогенезі зменшити необхідність лікування шляхом проведення селекційного добору в молочні стада тварин на основі інформації про наявність в генотипі бугаїв і теличок генетичної складової схильності/резистентності до маститів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати регіональних моніторингових досліджень особливостей перебігу та поширення запальних захворювань молочної залози корів, обґрунтована роль мікроорганізмів у їх виникненні, визначено склад мікробіоти та її резистентність до антибактеріальних препаратів за катаральної і субклінічної форм маститів. Констатовано нормалізуючий вплив комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на гематологічні параметри, імунну функцію та біохімічні показники крові та секрету молочної залози у хворих корів. Висвітлено генотипову обумовленість запальних процесів молочної залози у корів за допомогою ДНК-маркерів у системі «алелі гена BoLA-DRB3 – SCC».

1. Встановлено, що середній рівень захворюваності корів на субклінічний мастит у Хмельницькому регіоні у фермерських господарствах становив 28,9% від усього поголів'я тварин, у підсобних господарствах населення – 9,7%. У господарствах де проводилися досліді, зокрема у ТОВ «Перлина Поділля» захворюваність тварин на субклінічний мастит була на рівні 14,5%, в ФГ «Подільська марка» – 12,9%, а за клінічної форми маститу – 2,8 і 2,5% відповідно. Найчастіше мастит реєстрували у корів третьої лактації.

2. За клінічних форм маститів в асоціаціях патогенних мікроорганізмів значна частка належить стафілококам (41,2%). За прихованого перебігу захворювання переважають мікроорганізми родів *Streptococcus* (26,5%) та *Staphylococcus* (23,5%). Епізоотичні штами *Staphylococcus aureus* проявляють резистентність до 43,7% антибактеріальних препаратів, *Streptococcus agalactiae* – до 56,5%.

3. Захворювання корів запальними процесами молочної залози призводить до зміни гематологічних параметрів крові. Так, за катаральної форми маститу у крові хворих корів виявлено менший вміст гемоглобіну ($P < 0,05$) та загального протеїну ($P < 0,05$), натомість зареєстровано більшу кількість лейкоцитів ($P < 0,05$). При цьому у лейкограмі крові на тлі вірогідного зменшення частки лімфоцитів виявлено більшу кількість еозинофілів, моноцитів і паличкоядерних нейтрофілів

($P < 0,05 - 0,001$).

4. Констатовано імуносупресивний вплив цього захворювання на імунну функцію корів, зокрема активність специфічних факторів захисту. Зафіксовано зниження кількості й функціональної активності імунокомпетентних клітин, особливо Т-лімфоцитів. Так, кількість Т-лімфоцитів (загальних, активних і теофілін-резистентних) у крові корів з катаральним маститом була, відповідно, на 10,8 ($P < 0,001$), 9,1 ($P < 0,01$) і 4,7% ($P < 0,001$) меншою, ніж у контрольній, а у корів із субклінічним маститом, відповідно, на 5,9 ($P < 0,05$), 11,5 ($P < 0,001$) та 9,5% ($P < 0,001$). При цьому у крові хворих корів зареєстровано збільшення частки неактивних Т-лімфоцитів і зменшення популяції клітин із низькою і середньою щільністю рецепторів ($P < 0,05 - 0,01$).

5. Запальні процеси молочної залози у корів спричиняють інгібуючий вплив на активність гуморальної ланки неспецифічних факторів захисту, про це вказує нижча лізоцимна і бактерицидна активність сироватки крові та більший вміст циркулюючих імунних комплексів ($P < 0,05 - 0,01$). Натомість за виникнення маститу виявлено підвищення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації протеїнів (ОМП) на тлі зниження активності ензимів системи антиоксидантного захисту ($P < 0,05 - 0,01$).

6. Внутрішньом'язове введення хворим тваринам комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату спричиняло нормалізуючий вплив на морфологічні та біохімічні параметри крові, активність клітинної і гуморальної ланок імунної відповіді організму, про що свідчить наближення досліджуваних показників до рівня клінічно здорових тварин. Встановлено зменшення кількості лейкоцитів, паличкоядерних нейтрофілів, моноцитів та еозинофілів і підвищення концентрації гемоглобіну, загального протеїну та кількості еритроцитів у крові хворих корів за введення ліпосомального препарату ($P < 0,05 - 0,01$).

7. Констатовано активуючий вплив компонентів препарату на механізми природного й адаптивного імунітету у хворих корів. Зокрема, у крові збільшується кількість Т-лімфоцитів (загальних, активних і теофілін-резистентних) та підвищується їх функціональна активність, за рахунок перерозподілу авідності рецепторного апарату вказаної популяції імунокомпетентних клітин ($P < 0,05 -$

0,01). Разом з цим зростає лізоцимна й бактерицидна активність сироватки крові та зменшується вміст циркулюючих імунних комплексів ($P < 0,05 - 0,01$), що вказує на імуномодуючі властивості ліпосомального препарату.

8. Компоненти досліджуваного препарату сприяли відновленню балансу прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі хворих корів, про що свідчать зменшення у крові вмісту гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів, кетонів та альдегідних похідних окисної модифікації протеїнів ($P < 0,05 - 0,01$). Ці зміни зумовлені стимулювальним впливом чинників препарату на активність ключових ензимів системи антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидази, каталази та супероксиддисмутази ($P < 0,05 - 0,01$).

9. Терапевтичний ефект лікування катарального маститу корів комплексним ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату реєстрували в середньому на 3 – 5 добу і становив 90%, за субклінічного маститу – через 24 – 48 годин і становив 100%.

10. Виявлено вірогідні асоціації між двома алелями гена BoLA-DRB3 та низьким і високим рівнем кількості соматичних клітин у молоці корів. Алель BoLA-DRB3.2*24 мав асоціативний зв'язок з низьким вмістом соматичних клітин у молоці, алель BoLA-DRB3.2*22 – з високим рівнем КСК.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для лікування корів, хворих на катаральний і субклінічний мастит, рекомендується застосовувати високоефективний ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату шляхом введення його внутрішньом'язово дозою 0,04 мл/кг маси тіла тварини (з вмістом ЕТС 1,25%) тричі з інтервалом 24 години.

З метою оздоровлення дійного стада корів української чорно-рябої молочної породи від маститів проводити тестування теличок за геном BoLA-DRB3 для визначення наявності у тварин алелів BoLA-DRB3.2*22 та BoLA-DRB3.2*24.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боярчук, О. Д. (2013). *Біохімія стресу*. Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка». <http://hdl.handle.net/123456789/1103>.
2. Вальчук, О., & Столюк, В. 2010. Мастити в корів, спричинені патогенами бактеріальної природи, *Пропозиція*, 9, 30–31.
3. Вальчук, О.А., & Столюк, В.О. (2009). Мастит корів – ефективні шляхи вирішення проблеми. *Ветеринарна практика*, 4, 30–33.
4. Влізло, В.В., Федорук, Ратич, І.Б. та ін. (2012). *Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині*. Львів : Сполом, ISBN: 976-966-665-677-6.
5. Гевкан, І.І., Сливчук, Ю.І., Штапенко, О.В., Матюха, І.О., Федорова, С.В., & Сирванка, В.Я. (2013). Вплив органічного ліпосомального препарату йоду на біохімічні показники крові корів-первісток. *Науково-технічний бюлетень*, (1), 63–69.
6. Горюк, Ю.В. (2023). Обґрунтування, розробка та застосування бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит [Автореф. дис. д-ра вет. наук, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького] Retrieved from: https://uacademic.info/download/file/0523U100069/autoreferat-Реферат_ГОРЮК ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА.pdf.
7. Грабовський, С.С. (2014). Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету і рівень кортизолу в крові щурів за умов стресу. *Біологічні студії*, 8(1), 93–102.
8. Довгопол, В.Ф., & Плугатирьов, В.П. (2007). Ефективність протизапального засобу «Санобіт» при лікуванні корів, хворих на мастит. *Вісник Сумського НАУ*, 8(19), 31–34.
9. Дорофейчук В. Г. (1968). Лизоцимная активность сыворотки крови. *Лабораторное дело* . 1, 28–34.
10. Клименко, О.Ю., & Гассо, В.Я. (2011). Інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів у прудкої ящірки з екосистем різного рівня трансформації. *Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах: Матеріали VI*

Міжнародної наукової конференції. Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 292–294.

11. Козак, О., & Грищенко, О. (2022). Ринок молока і молочних продуктів: світові тенденції розвитку та перспективи для України. *Herald of Khmelnytskyi National University. Economic Sciences*, 308(4), 90–96. <https://doi.org/10.31891/2307-5740-2022-308-4-14>.

12. Колісник, М., Колісник, Г., Нідзюлка, Є., & Влізло, В. (2009). Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин. *Біологія тварин*, 11(1–2), 58–69.

13. Кондрашов, М.С. (2010). Поширеність мікозного маститу серед дійних корів. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*, 12, 3(45), 99–102.

14. Кошевой, В.П., Федоренко, С.Н., Онищенко, О.В., Пастернак, А.М., & Скляр, П.М. (2015). *Імунобіологія лактації у тварин: навчально-методичне видання*; за ред. проф. В.П. Кошевого. Дніпропетровськ: Герда.

15. Кузів, М.І., Кузів, Н.М., & Федорович В.В. (2012). Морфологічні і біохімічні показники крові та природна резистентність телиць української чорнорябої молочної породи. *Збірник наукових праць Подільського ДАТУ*, 20, 139–141.

16. Куртяк, Б.М., Собко, Г.В., & Бойко, О.П. (2015). Бактеріологічний моніторинг прихованих форм маститів – важлива складова у програмі профілактики маститів. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*, 17(2), 281–287.

17. Кухтин, М.Д. (2006). Динаміка мікробіологічного процесу мікрофлори молока (2006). *Науковий вісник Львівської національної академії ветмедицини ім. С.З. Гжицького*, 8, 2(29), 112–116.

18. Лавришин, Ю.Ю. (2020). Фармакокорекція імунної системи молодняку великої рогатої худоби за кадмієвого навантаження [Дис. д-ра філософії, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького]. Інституційний репозитарій Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій. <http://194.44.193.54:8080/xmlui/handle/123456789/510>.

19. Левківська, Н.Д. (2008). Мікрофлора секрету молочної залози та імунологічна реактивність організму корів, хворих на мастит [Автореф. дис.

канд. вет. наук, Одеський державний аграрний університет] Retrieved from: http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis64r_81/cgiirbis_64.exe?C21COM=2&I21DBN=ARD&P21DBN=ARD&Z21ID=&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1&Image_file_name=DOC/2008/08lndkhm.zip.

20. Левківська, Н.Д. (2010). Циркулюючі імунні комплекси при субклінічному маститі у корів. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького*, 12, 2(1), 183–185.

21. Лич, І., Волошина, І., & Пекло, А. (2013). Ліпосоми як засоби адресної доставки лікарських засобів. *Ukrainian food journal*, 2(3), 374–380.

22. Лупенко, Ю., Тулуш, Л., Грищенко, О., Чагаровський, В., Дідур, А., & Стріховський, Д. (2022). *Баланс молока та молокопродуктів (прогноз на 2022 р. та на період воєнного стану)*, Київ : ННЦ «ІАЕ», 24 с.

23. Масс, А.О., Овчаренко, Г.В., & Васецька, А.І. (2016). Ефективність діагностики, профілактики та терапії корів, хворих на мастит. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*, 18, 1(65), 101–104.

24. *Мастит: навчитися контролювати та діяти*. URL: <https://propozitsiya.com/ua/mastyt-navchytysya-kontrolyuvaty-ta-diyaty>

25. Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з курсу «Дослідження вільнорадикальних процесів у живих організмах». (2014). Під заг. ред. В.І. Луцака. *Видавництво Прикарпатського національного університету ім. Василя Стефаника*.

26. Міщенко, М.Д. (2008). Мастити – діагностика, лікування, профілактика в господарствах різної форми власності. *Ветеринарна медицина України*, 1, 39–40.

27. Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання. Чинний від 2014-01-01. Київ : Мінекономрозвитку України, 2014. III, 35 с. (Національний стандарт України).

28. Молоко та молочні продукти. Настанови з відбирання та проб: ДСТУ ISO 707:2002. [Чинний від 01.09.2002]. Київ : Держспоживстандарт України, 2002 (Національний стандарт України).

29. Нестерук, В.С., & Нагорна, Л.В. (2022). Епізоотична ситуація щодо маститу великої рогатої худоби в умовах господарств ТОВ фірма «Астарта-

Київ». *Вісник ПДАА*, 1, 186–193.

30. Паневник, В.В., Супрович, Т.М. (2016). Етіологічні чинники маститів корів української чорно-рябої молочної породи. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*, 18(3), 191–195.

31. Підрахунок соматичних клітин. Частина 1. Метод із застосуванням мікроскопа (контрольний метод) (ISO 13366-1:2008 IDF 148-1:2008): ДСТУ ISO 13366-1:2008. [Чинний від 2008-01-01]. Київ: Держстандарт України, 2008. 12 с. (Національний стандарт України).

32. Плахотнюк, І.М. (2013). Інформативність діагностики прихованого маститу у корів електронним визначником. *Збірник тез XII Міжнар. науково-практ. конф. професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва»*, 121–122.

33. Понкало, І., & Ковальчук, Н. (2016). Активність ензимів антиоксидантного захисту у молозиві корів за дії ліпосомальних препаратів. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 73, 186–190.

34. Понкало, Л.І. (2013). Вплив нових імунотропних засобів у вигляді ліпосомальної емульсії на хімічний склад молозива корів та їх продуктивність. *Ветеринарна медицина*, 97, 275–276.

35. *Поширеність збудників та контроль маститу на молочних фермах. Консультаційний Центр Асоціації виробників молока*: URL: <https://avm-kc.org.ua/uk/post/posirenist-zbudnikiv-ta-kontrol-mastitu-na-molocnih-fermah>.

36. Рацький, М.І. (2018). Гематологічний профіль корів різного рівня продуктивності та їх телят, за дії ліпосомального препарату. *Ветеринарна біотехнологія*, 32(1), 207–211.

37. Рудик, І.А., & Даниленко, В.П. (2011). Селекція молочної худоби за стійкістю до маститу. *Зб. наук. праць Вінницького національного аграрного університету*. Вінниця, 8(48), 54–58.

38. Сачук Р.М. (2021). Експериментально-теоретичне обґрунтування розробки препаратів для профілактики акушерської патології і субклінічного маститу корів та їх фармако-токсикологічна характеристика. [Дис. д-ра с.-г. наук, Львівський національний університет ветеринарної медицини та

біотехнологій імені Гжицького]. Інституційний репозитарій Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій. Retrieved from: https://uacademic.info/download/file/0521U100391/ДИСЕРТАЦІЯ_САЧУК_Р.М..pdf

39. Сисюк, Ю.О., Кравченко-Довга, Ю.В., Карповський, В.І., Данчук, О.В., & Журенко, О.В. (2018). Вплив типу вищої нервової діяльності на активність супероксиддисмутази та вміст купруму і цинку в крові корів. *Animal Biology*, 20(4), 55–60. <https://doi.org/10.15407/animbiol20.04.055>.

40. Собко, Г.В. (2016). Показники фагоцитозу нейтрофільних гранулоцитів крові корів, хворих на субклінічну форму маститу, та за дії препарату «Антимаст». *Науковий вісник Львівського НУВМБТ імені С.З. Гжицького*, 18, 3(71), 244–247.

41. Собко, Г.В., Брода, Н.А., Віщур, О.І., & Куртяк Б.М. (2016). Вплив препарату «Антимаст» на стан системи антиоксидантного захисту у корів, хворих на субклінічну форму маститу. *Науковий вісник Львівського НУВМБТ імені С.З. Гжицького*, 18, 1(65). 154–159.

42. Строяновська, Л., & Супрович, Т. (2022). Встановлення зв'язку між соматичними клітинами молока і ДНК-маркерами у корів. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 102–103, 111–117. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.102.19>.

43. Супрович Т.М. (2014). Молекулярно-генетичний аналіз головного комплексу гістосумісності в зв'язку зі стійкістю та сприйнятливістю до маститів у корів. [Дис. д-ра с.-г. наук, Інститут розведення і генетики тварин]. Retrieved from: <https://uacademic.info/download/file/0514U000471/dis1.doc/>

44. Супрович Т.М., & Супрович М.П. *Поліморфізм гена BoLA-DRB3 як маркер чутливості до захворювань великої рогатої худоби* : монографія. Кам'янець-Подільський : ПДАТУ, 2020. 185 с. URL: <http://188.190.33.55 :7980/jspui/handle/123456789/7983>.

45. Супрович Т.М., Супрович М.П., Данчук О.В., Строяновська Л.В. *Спосіб виявлення стійкості/схильності до маститу великої рогатої худоби у ранньому постнатальному онтогенезі* : пат. на корисну модель 151429 Україна : заявл. 31.01.2022; опубл. 20.07.2022. Бюл. №29.

46. Супрович, Т., & Строяновська, Л. (2023). Моніторинг маститу корів у

фермерських господарствах та його етіологічна структура. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка. Ветеринарні науки*, 1(38), 210–215. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2023-1.31>.

47. Супрович, Т., Супрович, М., & Паневник, В. (2017). Соматичні клітини молока та алельний поліморфізм гена BoLA-DRB3 при захворюваннях на мастит. *Стан і перспективи харчової науки та промисловості: тези доп. IV Міжнародної наук.-техн. конференції ТНТУ ім. І. Пулюя*. Тернопіль, 40–42.

48. Супрович, Т.М., & Влізло, В.В. (2013). Використання імуногенетичних маркерів для виявлення корів, резистентних або чутливих до маститів. *Біологія тварин*, 15(4), 119–127.

49. Супрович, Т.М., Супрович, М.П., Бандура, В.В., & Чорний, І.О. (2023). Генетичні дослідження великої рогатої худоби на основі ДНК-маркерів. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка. Ветеринарні науки*, 1(38), 192–2025. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2023-1.29>

50. Федак, В.Д., Шелевач, А.В., & Федак, Н.М. (2024). Біохімічні показники крові телиць і корів української чорно-рябої молочної породи різних типів конституції у постнатальному онтогенезі. *Передгірне та гірське землеробство і тваринництво*, 76(1), 140–148. doi: 10.32636/01308521.2024-(76)-1-14.

51. Чепурна, В., & Ободовська, М.В. (2022). Показники крові у корів з патологією молочної залози за дії ліпосомального препарату. *Cambridge*, 20, 147–149. Retrieved from: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Farchive.logos-science.com>.

52. Чепурна, В.А., Супрович, Т.М., Віщур, О.І., & Мізик, В.П. (2019). Система антиоксидантного захисту у корів, хворих на субклінічну форму маститу, за дії ліпосомального препарату. *Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок Інституту біології тварин*, 20(1), 117–122. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ntbibt_2019_20_1_20.

53. Шаран, М.М. (2008). Застосування ліпосомальної емульсії для введення гонадотропіну при індукції поліовуляції у корів-донорів. *Науково-технічний бюлетень інституту тваринництва*, 97, 157–161.

54. Abad, P., Arroyo-Manzanares, N., Gil, L., & García-Campana, A.M. (2017).

Use of onion extract as a dairy cattle feed supplement: monitoring propyl propane thiosulfonate as a marker of its effect on milk attributes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 793–799. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04395>.

55. Abdi, R. D., Gillespie, B. E., Ivey, S., Pighetti, G. M., Almeida, R. A., & Kerro Dego, O. (2021). Antimicrobial resistance of major bacterial pathogens from dairy cows with high somatic cell count and clinical mastitis. *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(1), 131. <https://doi.org/10.3390/ani11010131>.

56. Adkins, P. R. F., & Middleton, J. R. (2018). Methods for diagnosing mastitis. The veterinary clinics of North America. *Food animal practice*, 34(3), 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003>.

57. Aghamohammadi, M., Haine, D., Kelton, D. F., Barkema, H. W., Hogeveen, H., Keefe, G. P., & Dufour, S. (2018). Herd-Level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. *Frontiers in veterinary science*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>

58. Aibara, N., & Ohyama, K. (2020). Revisiting immune complexes: Key to understanding immune-related diseases. *Advances in clinical chemistry*, 96, 1–17. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.11.001>.

59. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.

60. Amit Kumar Singh. (2022). A comprehensive review on subclinical mastitis in dairy animals: Pathogenesis, factors associated, prevalence, economic losses and management strategies. *CABI Reviews*, 17, 057. doi: 10.1079/cabireviews202217057.

61. Amorena, B., & Stone, W.H. (1980). Bovine Lymphocyte Antigens (BoLA): Aserologie, genetic and histocompatibility antigen. *Tissue Antigens*, 16(3), 212–225. doi:10.1111/j.1399-0039.1980.tb00297.x.

62. Anderson, B. H., Watson, D. L., & Colditz, I. G. (1999). The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Veterinary research communications*, 23(7), 399–413. <https://doi.org/10.1023/a:1006365324335>.

63. Aniulis, E., Japertas, S., & Klimaite, J. (2003). Prevalence and treatment of subclinical mastitis in cows. *Medycyna Weterynaryjna*, 59(10), 872–875.

64. Aqib, A.I. (2019). *Dairy Staphylococcus aureus: Epidemiology, drug susceptibilities, drug modulation, and preventive measures*. In: Ijaz M, editor. Rijeka: IntechOpen; p. Ch. 3. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.74552>.
65. Arreola, R., Quintero-Fabián, S., López-Roa, R.I., Flores-Gutiérrez, E.O., Reyes-Grajeda, J.P., Carrera-Quintanar, L., & Ortuño-Sahagún, D. (2015). Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *Journal of immunology research*, 2015, 401630. <https://doi.org/10.1155/2015/401630>.
66. Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 36–49. doi:10.1017/ S1466252319000094.
67. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
68. B Braun, U., Gerspach, C., Riond, B., Oeschli, C., Corti, S., & Bleul, U. (2021). Haematological findings in 158 cows with acute toxic mastitis with a focus on the leukogram. *Acta veterinaria Scandinavica*, 63(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13028-021-00576-0>.
69. Bangar, Y. C., Singh, B., Dohare, A. K., & Verma, M. R. (2015). A systematic review and meta-analysis of prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in India. *Tropical animal health and production*, 47(2), 291–297. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0718-y>
70. Bangham, A.D. (1994). Review of latic, liposomes: from physics to applications. *Biophysical Journal*, 67(3), 1358–1359.
71. Barkema, H.W., von Keyserlingk, M.A., Kastelic, J.P., Lam, T.J., Luby, C., Roy, J.P., LeBlanc, S.J., Keefe, G.P., & Kelton, D.F. (2015). Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *Journal of dairy science*, 98(11), 7426–7445. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9377>.
72. Bechtold, V., Petzl, W., Huber-Schlenstedt, R., & Sorge, U.S. (2024). Distribution of bovine mastitis pathogens in quarter milk samples from Bavaria, Southern Germany, between 2014 and 2023 – A Retrospective Study. *Animals*, 14(17),

2504. <https://doi.org/10.3390/ani14172504>.

73. Berezovskyi, A., Dovbnya, A., Fotin, O., Kisil, D., & Morozov, B. (2023). Rationale for the prevention of mastitis in cows during the dry period and after calving. *Scientific Horizons*, 26(4), 43–53. <https://doi.org/10.48077/scihor4.2023.43>.

74. Berry, E.A., Hogeveen, H., & Hillerton, J.E. (2004). Decision tree analysis to evaluate dry cow strategies under UK conditions. *The Journal of dairy research*, 71(4), 409–418. <https://doi.org/10.1017/s0022029904000433>.

75. Biggs, A. (2017). Update on dry cow therapy 1. antibiotic v non-antibiotic approaches. *In Practice*, 39, 328–333. <https://doi.org/10.1136/inp.j3107>.

76. Blowey, R.W. (2010). *Mastitis control in dairy herds*. 2nd ed. Cambridge, Mass, MA: CABI;

77. Blum, S.E., Heller, E.D., Jacoby, S., Krifucks, O., & Leitner, G. (2017). Comparison of the immune responses associated with experimental bovine mastitis caused by different strains of *Escherichia coli*. *The Journal of dairy research*, 84(2), 190–197. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000206>.

78. Boaghi, E., Capcanari, T., Mija, N., Deseatnicova, O., & Opopol, N. (2018). The evolution of food products consumption in republic of Moldova in the demographic transition period. *Journal of Engineering Science*, XXV (4), 74–81. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2576744>.

79. Borghesi, L., & Milcarek, C. (2007). Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime? *Cancer research*, 67(9), 3989–3993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0182>.

80. Brahim, N. (2017). Review on mastitis and its economic effect. *Canadian Journal of Scientific Research*, 6(1), 13–22. doi: 10.5829/idosi.cjsr.2017.13.22.

81. Brouwers, J.F., & Gadella, B.M. (2003). In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free radical biology & medicine*, 35(11), 1382–1391. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.010>.

82. Cao, W., Xu, Y., Huang, Y., & Xu, T. (2023). Isolation of pathogenic bacteria from dairy cow mastitis and correlation of biofilm formation and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in Jiangsu, China. *Agriculture*, 13(10), 1984. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101984>.

83. Chan, J.Y., Yuen, A.C., Chan, R. Y., & Chan, S.W. (2013). A review of the

cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phytotherapy research: PTR*, 27(5), 637–646. <https://doi.org/10.1002/ptr.4796>.

84. Cheng, W.N., & Han, S.G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>.

85. Chepurna, V.A., Suprovych, T.M., Vishchur, O.I., Mizik, V.P., & Solovodzinska, I.Y. (2021). Influence of liposomal drug on the intensity of proteins oxide modification processes in subclinical mastitis of cows. *The Animal Biology*, 23 (2), 3–7. doi:10.15407/animbiol23.02.003.

86. Chu, M.X., Ye, S.C., Qiao, L., Wang, J.X., Feng, T., Huang, D.W., Cao, G.L., Di, R., Fang, L., & Chen, G.H. (2012). Polymorphism of exon 2 of BoLA-DRB3 gene and its relationship with somatic cell score in Beijing Holstein cows. *Molecular biology reports*, 39(3), 2909–2914. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1052-3>.

87. Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and classification of mastitis. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(12), 2212. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>.

88. *Dairyglobal. Economics of mastitis control in dairy cows*: URL: <https://www.dairyglobal.net/health-and-nutrition/health/economics-of-mastitis-control-in-dairy-cows/>

89. Dall'Olio, E., De Rensis, F., Martignani, E., Miretti, S., Ala, U., Cavalli, V., Cipolat-Gotet, C., Andrani, M., Baratta, M., & Saleri, R. (2025). Differential Expression of miR-223-3p and miR-26-5p according to different stages of mastitis in dairy cows. *Biomolecules*, 15, 235. doi:10.20944/preprints202501.0990.v1.

90. Davies, M.J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805–825. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>.

91. De Matteis, G., Grandoni, F., Scatà, M.C., Catillo, G., Moioli, B., & Buttazzoni, L. (2020). Flow cytometry-detected immunological markers and on farm recorded parameters in composite cow milk as related to udder health status. *Veterinary sciences*, 7(3), 114. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030114>.

92. De Vliegher, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H.W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of dairy science*, 95(3), 1025–1040. <https://doi.org/>

10.3168/jds.2010-4074.

93. Dervishi, E., Zhang, G., Hailemariam, D., Dunn, S.M., & Ametaj, B.N. (2015). Innate immunity and carbohydrate metabolism alterations precede occurrence of subclinical mastitis in transition dairy cows. *Journal of animal science and technology*, 57, 46. <https://doi.org/10.1186/s40781-015-0079-8>.

94. Determining, U.S. (2015). Determining U.S. Milk quality using bulk-tank somatic cell counts. *USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)*, Fort Collins, CO2015.

95. Dietz, A.B., Cohen, N.D., Timms, L., & Kehrli, M.E. (1997). Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 406–412. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75951-4.

96. Dimov, N., Kastner, E., Hussain, M., Perrie, Y., & Szita, N. (2017). Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system. *Scientific reports*, 7(1), 120–145. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11533-1>.

97. Doehring, C., & Sundrum, A. (2019). The informative value of an overview on antibiotic consumption, treatment efficacy and cost of clinical mastitis at farm level. *Preventive veterinary medicine*, 165, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.02.004>.

98. du Preez, J.H. (2000). Bovine mastitis therapy and why it fails. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(3), 201–208. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i3.714>.

99. Duangjinda, M., Buayia, D., Pattarajinda, V., Phasuk, Y., Katawatin, S., Vongpralub, T., & Chaiyotvittayakul A. (2009). Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein×Zebu. *Journal of animal science*, 87, 469–476. doi: 10.2527/jas.2007-0789.

100. Dufour, S., Labrie, J., & Jacques, M. (2019). The mastitis pathogens culture collection. *Microbiology resource announcements*, 8(15), e00133-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00133-19>.

101. Duse, A., Persson-Waller, K., & Pedersen, K. (2021). Microbial an etiology, antibiotic susceptibility and pathogen-specific risk factors for udder pathogens from

clinical mastitis in dairy cows. *Animals*, 11, 2113. <https://doi.org/10.3390/ani11072113>.

102. Dyson, R., Charman, N., Hodge, A., Rowe, S. M., & Taylor, L. F. (2022). A survey of mastitis pathogens including antimicrobial susceptibility in southeastern Australian dairy herds. *Journal of dairy science*, 105(2), 1504–1518. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20955>.

103. Egyedy, A.F., & Ametaj, B.N. (2022). Mastitis: impact of dry period, pathogens, and immune responses on etiopathogenesis of disease and its association with periparturient diseases. *Dairy*, 3(4), 881–906. <https://doi.org/10.3390/dairy3040061>.

104. Ellis, S. A., & Codner, G. (2012). The impact of MHC diversity on cattle T cell responses. *Veterinary immunology and immunopathology*, 148(1–2), 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.009>.

105. Fotina, T.I., Nahorna, L.V., & Nesteruk, V.S. (2021). Efficiency of application of the preparation on the basis of iodine for mastitis in cows. *Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology*, 22(1), 251–256. <https://doi.org/10.36359/scivp.2021-22-1.31>.

106. Franco, R., Casanovas, B., Camps, J., Navarro, G., & Martínez-Pinilla, E. (2021). Antioxidant supplements versus health benefits of brief/intermittent exposure to potentially toxic physical or chemical agents. *Current issues in molecular biology*, 43(2), 650–664. <https://doi.org/10.3390/cimb43020047>.

107. Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., Blanco-Chavez, J., & American Society for Veterinary Clinical Pathology (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary clinical pathology*, 41(4), 441–453. <https://doi.org/10.1111/vcp.12006>.

108. Gao, J., Barkema, H. W., Zhang, L., Liu, G., Deng, Z., Cai, L., Shan, R., Zhang, S., Zou, J., Kastelic, J. P., & Han, B. (2017). Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. *Journal of dairy science*, 100(6), 4797–4806. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12334>.

109. Garcia, S.N., Osburn, B.I., & Cullor, J.S. (2019). A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One health* (Amsterdam, Netherlands), 7, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>.

110. Ghai, S., Saini, S., Ansari, S., Verma, V., Chopra, S., Sharma, V., Devi, P., & Malakar, D. (2022). Allogenic umbilical cord blood-mesenchymal stem cells are more effective than antibiotics in alleviating subclinical mastitis in dairy cows. *Theriogenology*, 187, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.001>.
111. *Global market size, forecast, and trend highlights over 2023–2033*. URL: <https://www.researchnester.com/reports/bovine-mastitis-market/4647>
112. Gomes, F., Saavedra, M. J., & Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and disease*, 74(3), ftw006. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>.
113. Green, M.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E., & Bradley, A.J. (2007). National intervention study of mastitis control in dairy herds in England and Wales. *The Veterinary record*, 160(9), 287–293. <https://doi.org/10.1136/vr.160.9.287>.
114. Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., & Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews*, 50(3), 245–259. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00160-0).
115. Gudra, D., Valdovska, A., Jonkus, D., Galina, D., Kairisa, D., Ustinova, M., Viksne, K., Fridmanis, D., & Kalnina, I. (2023). Genomic characterization and initial insight into mastitis-associated SNP profiles of local Latvian *Bos taurus* breeds. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(17), 2776. <https://doi.org/10.3390/ani13172776>.
116. Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., & Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International journal of pharmaceutics*, 601, 120571. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>.
117. Günther, J., Koy, M., Berthold, A., Schuberth, H. J., & Seyfert, H. M. (2016). Comparison of the pathogen species-specific immune response in udder derived cell types and their models. *Veterinary research*, 47, 22. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0307-3>.
118. Gurao, A., Kashyap, S. K., & Singh, R. (2017). B-defensins: An innate defense for bovine mastitis. *Veterinary world*, 10(8), 990–998. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.990-998>.
119. Halenova, T.I., Nikolaeva, I.V., Nakonechna, A.V., Bolibrukh, K.B., Monka, N.Y., Lubenets, V.I., Savchuk, O.M., Novikov, V. P., & Ostapchenko, L.I. (2015). The search of compounds with antiaggregation activity among S-esters of thiosulfonic acids. *Ukrainian Biochemical Journal*, 87(5), 83–92. doi:10.15407/ubj87.05.083.

120. Hamada, R., Giovambattista, G., Metwally, S., Borjigin, L., Polat Yamanaka, M., Matsuura, R., Ali, A.O., Mahmoud, H., Mohamed, A., Kyaw Moe, K., Takeshima, S.N., Wada, S., & Aida, Y. (2024). First characterization of major histocompatibility complex class II DRB3 diversity in cattle breeds raised in Egypt. *Gene*, 918, 148491. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148491>.
121. Hammer K.A., & Carson C.F. (2011). Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In book: *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*, 255–306. doi:10.1002/9780470976623.ch11.
122. Harada, K., Irie, S., Ohnishi, M., & Kataoka, Y. (2020). assessment of the usefulness of Cefapirin and Cefalonium disks for susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(4), 197. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040197>.
123. Hauck, A. K., & Bernlohr, D. A. (2016). Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of lipid research*, 57(11), 1976–1986. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066597>.
124. Haugaard, K., Tusell, L., Perez, P., Gianola, D., Whist, A.C., & Heringstad, B. (2013). Prediction of clinical mastitis outcomes within and between environments using whole-genome markers. *Journal of dairy science*, 96(6), 3986–3993. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6133>.
125. Heikkilä, A.M., Nousiainen, J.I., & Pyörälä, S. (2012). Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *Journal of Dairy Science*, 95, 139–150. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4321>.
126. Heiniger, D., van den Borne, B.H., Lechner, I., Tschopp, A., Strabel, D., Steiner, A., & Meier, H. (2014). Kosten-Nutzen-Analyse einer Intervention zur Verbesserung der Eutergesundheit in Schweizer Milchviehbetrieben [Cost-benefit analysis of an intervention to improve udder health in Swiss dairy farms]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 156(10), 473–481. <https://doi.org/10.1024/0036-7281/a000634>.
127. Heringstad, B., Klemetsdal, G., & Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: A review with focus on the situation in the Nordic Countries. *Livestock Production Science*, 64, 94–106. doi: 10.1016/S0301-6226(99)00128-1.
128. Himanshu, A., Sitasharan, P., & Singhai, A.K. (2011). Liposomes as drug carriers. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*. 2(7), 945–951.
129. Hogeveen, H., Huijps, K., & Lam, T. J. (2011). Economic aspects of mastitis:

new developments. *New Zealand veterinary journal*, 59(1), 16–23. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>.

130. Hommels, N.M.C., Ferreira, F.C., van den Borne, B.H.P., & Hogeveen, H. (2021). Antibiotic use and potential economic impact of implementing selective dry cow therapy in large US dairies. *Journal of dairy science*, 104(8), 8931–8946. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20016>.

131. Horiuk, Y.V. (2021). Therapeutic efficacy of «Phagomast» bacteriophage preparation for the treatment of cows' subclinical mastitis. *Bulletin of Poltava State Agrarian Academy*, (3), 204–209. doi:10.31210/visnyk2021.03.25.

132. Horiuk, Yu.V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Yu.B., & Horiuk, V.V. (2018). Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 20(83), 115–119. doi: 10.15421/nvlvet8322.

133. Hosseinzadeh, S., Rafat, S. A., Javanmard, A., & Fang, L. (2024). Identification of candidate genes associated with milk production and mastitis based on transcriptome-wide association study. *Animal genetics*, 55(3), 430–439. <https://doi.org/10.1111/age.13422>.

134. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in microbiology*, 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.

135. Huijps, K., Lam, T. J., & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *The Journal of dairy research*, 75(1), 113–120. <https://doi.org/10.1017/S0022029907002932>.

136. Ibarra Rosero, E.M., Ormaza Montenegro, D.J., & Rueda Abad, R.J. (2022). Mastitis bovina en el cantón Montufar – Carchi. Prevalencia, agente causal y factores de riesgo. *AXIOMA*. 2021, 1(26), 5–10. doi: 10.26621/ra.v1i26.735.

137. IDF. (2022). *Guidelines for the use and interpretation of bovine milk somatic cell count*. Bull. DF 2013, 466, 5118.

138. Ismail, Z.B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary world*, 10(9), 1057–1062. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1057-1062>.

139. Iwano, H., Inoue, Y., Takasago, T., Kobayashi, H., Furusawa, T., Taniguchi,

K., Fujiki, J., Yokota, H., Usui, M., Tanji, Y., Hagiwara, K., Higuchi, H., & Tamura, Y. (2018). Bacteriophage Φ SA012 has a broad host range against *Staphylococcus aureus* and effective lytic capacity in a mouse mastitis model. *Biology*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.3390/biology7010008>.

140. Jamali, H., Barkema, H.W., Jacques, M., Lavallée-Bourget, E.M., Malouin, F., Saini, V., Stryhn, H., & Dufour, S. (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *Journal of dairy science*, 101(6), 4729–4746. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13730>.

141. Jondal, M., Holm, G., & Wigzell, H. (1972). Surface markers on human T and B-lymphocytes: i.a large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *The journal of experimental medicine*, 136(2), 207–215. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.136.2.207>.

142. Kerro Dego, O. (2021). Bovine Mastitis: Part I. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.93483.

143. Kerro Dego, O. (2021). Control and Prevention of Mastitis: Part Two. *IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.93484.

144. Kober, A.K.M.H., Saha, S., Islam, M.A., Rajoka, M.S.R., Fukuyama, K., Aso, H., Villena, J., & Kitazawa, H. (2022). immunomodulatory effects of probiotics: a novel preventive approach for the control of bovine mastitis. *Microorganisms*, 10(11), 2255. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112255>.

145. Koreyba, L. (2022). Dynamics of biochemical parameters of blood of cows during the dry period for stall keeping. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 24(108), 11-15. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10802>.

146. Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., & Turner, P.E. (2019). Phage Therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell host & microbe*, 25(2), 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>.

147. Krishnamoorthy, P., K.P. Suresh, S. Saha, G. Govindaraj, B.R. Shome, & Parimal, Roy. (2017). Meta-analysis of prevalence of subclinical and clinical mastitis, major mastitis pathogens in dairy cattle in India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 1214-1234. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.141>.

148. Krömker, V., & Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment – reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 21–29. doi:10.1111/rda.13032.

149. Kukeeva, A.A., Abdrakhmanov, T.Z., Akhmetov, A.N., Terklibaev, A.A., & Kamsaev, K.M. (2023). Development of unconventional treatments for mastitis in dairy cattle. *Open veterinary journal*, 13(2), 193–201. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i2.7>.

150. Kukhtyn, M., Horiuk, Y., Salata, V., Klymyk, V., Vorozhbit, N., & Rushchinskaya, T. (2021). Staphylococcus aureus of raw cow's milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 23(102), 53–59. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208>.

151. Kukhtyn, M.D., Kovalenko, V.L., Pokotylo, O.S., Horyuk, Yu. V., Horyuk, V.V., & Pokotylo, O.O. (2017). Staphylococcal contamination of raw milk and handmade dairy products, which are realized at the markets of Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 3(1), 12–16.

152. Kulberg, S., Heringstad, B., Guttersrud, O.A., & Olsaker, I. (2007). Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *Journal of animal breeding and genetics*, 124(4), 201–217. doi: 10.1111/j.1439-0388.2007.00662.x.

153. Kumari N., Loat S., Saini S., Dhilor N., Kumar A., & Kataria R.S. (2019). Role of BoLA-RB3 genetic diversity against resistance to mastitis in cattle: Review. *Journal of Veterinary Science and Research*, 1, 30–36. doi: 10.36811/jvsr.2019.110004.

154. Kumari, K., & Augusti, K.T. (2007). Lipid lowering effect of S-methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* Linn in high cholesterol diet fed rats. *Journal of ethnopharmacology*, 109(3), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.045>.

155. Kurtyak, B.M., Boyko, P.K., Boyko, O.P., Sobko, G.V., Romanovych, M.S., Pundyak, T.O., Mandygra, Yu.M., & Gutyj, B.V. (2021). Autogenous vaccines are an effective means of controlling the epizootic process of mastitis in cows. *Ukrainian Journal of Ecology*, 11 (3), 145–152. doi:10.15421/2021_157

156. Lago, A., Godden, S.M., Bey, R., Ruegg, P.L., & Leslie, K. (2011). The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological

outcomes. *Journal of dairy science*, 94(9), 4441–4456. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4046>.

157. Landers, T.F., Cohen, B., Wittum, T.E., & Larson, E.L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports* (Washington, D.C.: 1974), 127(1), 4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>.

158. LeBlanc, S.J., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Duffield, T.F., & Leslie, K.E. (2006). Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 89(4), 1267–1279. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72195-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72195-6).

159. Leitner, G., Zilberman, D., Papirov, E., & Shefy, S. (2018). Assessment of acoustic pulse therapy (APT), a non-antibiotic treatment for dairy cows with clinical and subclinical mastitis. *PloS One*, 13(7), e0199195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199195>.

160. Li, X., Xu, C., Liang, B., Kastelic, J.P., Han, B., Tong, X., & Gao, J. (2023). Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1160350. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1160350>.

161. Liang, D., Arnold, L.M., Stowe, C.J., Harmon, R.J., & Bewley, J.M. (2017). Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model. *Journal of dairy science*, 100(2), 1472–1486. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11565>.

162. Liu, P., Chen, G., & Zhang, J. (2022). A Review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(4), 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.

163. Liu, S., Guo, D., Guo, Y., & Zhou, W. (2011). Preparation and pharmacokinetics of ceftiofur sodium liposomes in cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(1), 35–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2010.01190.x>.

164. Lopes, T.S., Fontoura, P.S., Oliveira, A., Rizzo, F.A., Silveira, S., & Streck, A.F. (2020). Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in veterinary science*, 131, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>.

165. Lubenets, V., Karpenko, O., Ponomarenko, M., Zahoriy, G., Krychkovska, A., & Novikov, V. (2013). Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure. *Chemistry and Chemical Technology*, 7(2), 119–124. <https://doi.org/10.23939>

/chcht07.02.119.

166. Lubenets, V., Stadnytska, N., Baranovych, D., Vasylyuk, S., Karpenko, O., Havryliak, V., & Novikov, V. (2019). Thiosulfonates: The prospective substances against fungal infections. *IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.84436.

167. Lubenets, V., Vasylyuk S., Monka, N., Bolibrukh, Kh., Komarovska-Porokhnyavets, O., Baranovych, D., Musyanovych, R., Zaczynska, E., Czarny, A., Nawrot, U., & Novikov, V. (2017). Synthesis and antimicrobial properties of 4-acylaminobenzenethiosulfoacid S-esters. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 266–274. doi:10.1016/j.jsps.2016.06.00.

168. Lubenets, V., Vasylyuk, S., Baranovych, D., & Novikov, V. (2006). *Method for the preparation of alkyl esters of 4-aminobenzene sulfonic acid*. Patent of Ukraine 14985, filed November 07, 2005, issued June 15, 2006.

169. Lubenets, V.I., Havryliak, V.V., Pylypets, A.Z., & Nakonechna, A.V. (2018). Changes in the spectrum of proteins and phospholipids in tissues of rats exposed to thiosulfonates. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(4), 495–500. doi:10.15421/021874.

170. Lundberg, Å., Nyman, A.K., Aspán, A., Börjesson, S., Unnerstad, H.E., & Waller, K.P. (2016). Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. *Journal of dairy science*, 99(3), 2102–2117. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9487>.

171. Luo, S., Wang, Y., Kang, X., Liu, P., & Wang, G. (2022). Research progress on the association between mastitis and gastrointestinal microbes in dairy cows and the effect of probiotics. *Microbial pathogenesis*, 173(Pt A), 105809. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105809>.

172. Mampuy P., McElroy C.R., Clark J.H., Orru R.V.A., & Maes B.U.W. (2019). Thiosulfonates as emerging reactants: synthesis and applications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 362(1), 3–64. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900864>.

173. Mazurenko, V., Dreval, D., & Sobko, I. (2020). Biodiversity of species and antimicrobial resistance of bovine milk with clinical and subclinical mastitis. *Bacterial Empire*, 3(4), 77–80. <https://doi.org/10.36547/be.2020.3.4.77-80>.

174. McEwen, S.A., & Fedorka-Cray, P.J. (2002). Antimicrobial use and resistance

in animals. *Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of America*, 34 Suppl 3, S93–S106. <https://doi.org/10.1086/340246>.

175. Middleton, J. R., Fox, L. K., & Pighetti, G. (2017). *Laboratory handbook on bovine mastitis, national mastitis council*, Madison, WI, New Prague, MN,

176. Morales-Ubaldo, A.L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza-Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and animal science*, 21, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306>.

177. Mrode, R.A., & Swanson, G.J.T. (1996). Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. *Animal Breeding Abstracts*, 64, 847–857.

178. Munoz, M. A., Welcome, F. L., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2007). Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *Journal of clinical microbiology*, 45(12), 3964–3971. <https://doi.org/10.1128/JCM.00795-07>.

179. Nakamura, Y., Matsuo, T., Shimoi, K., Nakamura, Y., & Tomita, I. (1993). S-methyl methane thiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from *Brassica oleracea* L. var. botrytis. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 16(2), 207–209. <https://doi.org/10.1248/bpb.16.207>.

180. Ndahetuye, J.B., Persson, Y., Nyman, A.K., Tukei, M., Ongol, M.P., & Båge, R. (2019). Etiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda. *Tropical animal health and production*, 51(7), 2037–2044. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01905-2>.

181. Nepravishta, R., Sabelli, R., Iorio, E., Micheli, L., Paci, M., & Melino, S. (2012). Oxidative species and S-glutathionyl conjugates in the apoptosis induction by allyl thiosulfate. *The FEBS journal*, 279(1), 154–167. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08407.x>.

182. Oliveira, C., Sousa, M., Silva, N., Mendonça, C., Silveira, J., Oaigen, R., Andrade, S., Barbosa, J. (2011). Prevalence and etiology of bovine mastitis in the dairy region of Rondon do Pará, state of Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(2), 104–110. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000200002>.

183. Oriabinska, L.B., Starovoitova, S.O., Vasylyuk, S.V., Novikov, V.P., & Lubenets, V.I. (2017). Ethylthiosulfanilate effect on *Candida tropicalis*. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 89(5), 70–76. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj89.05.070>.
184. Osterås, O., & Sølverød, L. (2009). Norwegian mastitis control programmer. *Irish veterinary journal*, 62 Suppl 4(Suppl 4), S26–S33. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S26>.
185. Østerås, O., Landin, H., Kulkas, L., Farre, M., & Reiersen, J. (2019). The udder health in the Nordic countries. *IDF Mastitis Conference*. Copenhagen, Denmark: IDF, 52–56.
186. Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J.J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patiño, A., & Baizabal-Aguirre, V.M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *The Journal of infection*, 54(4), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.010>.
187. Pal, M. (2018). Mastitis: A major production disease of dairy animals. *Agriculture World*, 4, 46–51.
188. Paladiychuk, O.R. (2021). The preventive measures of mastitis in cows during the dry period. *Colloquium-journal (Veterinary sciences)*, 90, 9–15.
189. Paulrud, C.O. (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary research communications*, 29(3), 215–245. <https://doi.org/10.1023/b:verc.0000047496.47571.41>.
190. Peinado, M.J., Ruiz, R., Echávarri, A., & Rubio, L.A. (2012). Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens in vivo. *Poultry science*, 91(9), 2148–2157. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02280>.
191. Persson, Y., Nyman, A. K., & Grönlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta veterinaria Scandinavica*, 53(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-36>.
192. Petzer, I.M., Karzis, J., Donkin, E.F., Webb, E.C., & Etter, E.M. (2017). Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 84(1), e1–e10. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v84i1.1269/>
193. Piepers, S., Prenafeta, A., Verbeke, J., De Visscher, A., March, R., & De

Vliegheer, S. (2017). Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *Journal of dairy science*, 100(1), 769–782. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11269>.

194. Plowman, J.E., Deb-Choudhury, S., Grosvenor, A.J. & Dyer, J.M. (2013). Protein oxidation: identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12, 1960–1967. <https://doi.org/10.1039/c3pp50182e>.

195. Pokorska, J., Sawicki, S., Gabryś, J. et al. (2024). The use of stem cells in the treatment of mastitis in dairy cows. *Scientific reports*, 14, 10349. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61051-0>.

196. Pollitt, E. J. G., Szkuta, P. T., Burns, N., & Foster, S. J. (2018). *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS pathogens*, 14(6), e1007112. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112>.

197. Ponnampalam, E.N., Kiani, A., Santhiravel, S., Holman, B.W. B., Lauridsen, C., & Dunshea, F. R. (2022). The importance of dietary antioxidants on oxidative stress, meat and milk production, and their preservative aspects in farm animals: antioxidant action, animal health, and product quality-invited review. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(23), 3279. <https://doi.org/10.3390/ani12233279>.

198. Poppek, D., & Grune, T. (2006). Proteasomal defence of oxidative protein modifications. *Antioxidants Redox Signaling*, 8(1–2), 173–184. doi:10.1089/ars.2006.8.173.

199. Rainard, P., & Riollot, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary research*, 37(3), 369–400. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006007107>.

200. Rajala-Schultz, P., Nødtvedt, A., Halasa, T., & Persson Waller, K. (2021). Prudent use of antibiotics in dairy cows: the Nordic approach to udder health. *Frontiers in veterinary science*, 8, 623998. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623998>.

201. Reidel, I.G., Camussone, C., Suarez Archilla, G.A., Calvinho, L.F., & Veaute, C. (2019). Liposomal and CpG-ODN formulation elicits strong humoral immune responses to recombinant *Staphylococcus aureus* antigens in heifer calves. *Veterinary immunology and immunopathology*, 212, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.04.011>.

202. Reshii, A.A., Husain, I., Bhat, S.A., Rehman, M.U., Razak, R., Bilal, S., & Mir, M.R. (2015). Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *International Journal of Current Research and Review*, 7(5), 48–55.
203. Ricciotti, E., & FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
204. Roberson J. R. (2003). Establishing treatment protocols for clinical mastitis. The Veterinary clinics of North America. *Food animal practice*, 19(1), 223–234. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(02\)00071-3](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(02)00071-3).
205. Röhrig, C., Huemer, M., Lorgé, D., Luterbacher, S., Phothaworn, P., Schefer, C., Sobieraj, A. M., Zinsli, L. V., Mairpady Shambat, S., Leimer, N., Keller, A. P., Eichenseher, F., Shen, Y., Korbsrisate, S., Zinkernagel, A. S., Loessner, M. J., & Schmelcher, M. (2020). Targeting hidden pathogens: Cell-penetrating enzybiotics eradicate intracellular drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 11(2), e00209-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00209-20>.
206. Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive veterinary medicine*, 122(3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.006>.
207. Rosales, C. (2017). Fcγ Receptor heterogeneity in leukocyte functional responses. *Frontiers in immunology*, 8, 280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00280>.
208. Roy, S.M., Riley, M.A., & Crabb, J.H. (2016). Treating bovine mastitis with nisin: a model for the use of protein antimicrobials in veterinary medicine. In book: *The bacteriocins: current knowledge and future prospects publisher: Caister Academic Press*, 127–140. doi:10.21775/9781910190371.07.
209. Rozenberg, S., Body, J. J., Bruyère, O., Bergmann, P., Brandi, M. L., Cooper, C., Devogelaer, J. P., Gielen, E., Goemaere, S., Kaufman, J. M., Rizzoli, R., & Reginster, J. Y. (2016). Effects of Dairy Products Consumption on Health: Benefits and Beliefs--A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. *Calcified tissue international*, 98(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0062-x>
210. Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*, 100(12), 10381–10397.

211. Rupp, R., & Boichard, D. (2003). Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 34, 671–688. doi: 10.1051/vetres:2003020.
212. Rupp, R., Hernandez, A., & Mallard, B.A. (2007). Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *Journal of dairy science*, 90(2), 1029–1038. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71589-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71589-8).
213. Rüsç, P. (2000). Wirtschaftliche Bedeutung – was kostet Mastitis? In: M. Walkenhorst (Ed.) Mastitis: Kein Wundermittel gegen die Kuhkrankheit Nummer eins. *Bio Aktuell*, 9/2000.
214. Sarkar, S. (2016). Microbiological safety concerns of raw milk. *The Journal of Food and Nutritional Disorders*, 1(2), 105. <http://dx.doi.org/10.19104/jfnd.2016.105>.
215. Schwarz, D., Rivas, A.L., König, S., Diesterbeck, U.S., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., & Czerny, C.P. (2013). CD2/CD21 index: a new marker to evaluate udder health in dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(8), 5106–5119. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6804>.
216. Shade, C.W. (2016). Liposomes as Advanced delivery systems for nutraceuticals. *Integrative medicine* (Encinitas, Calif.), 15(1), 33–36.
217. Sharif, A., Umer, M., & Muhammad, G. (2009). Mastitis control in dairy production. *Journal of agriculture & social sciences*, 5, 102–105.
218. Sharif, S., Mallard, B.A., Wilkie, B.N., Sargeant, J.M., Scott, H.M., Dekkers, J.C., & Leslie, K.E. (1998). Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29, 185–193. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.1998.00318.x>.
219. Sharma, N., Singh, N., & Bhadwal, M. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 429–38. doi:10.5713/ajas.2011.10233.
220. Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yatoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K.P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *The veterinary quarterly*, 41(1), 107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>.

221. Sheppard, A.E., Vaughan, A., Jones, N., Turner, P., Turner, C., Efstratiou, A., Patel, D., Modernising Medical Microbiology Informatics Group, Walker, A.S., Berkley, J.A., Crook, D.W., & Seale, A.C. (2016). Capsular typing method for *Streptococcus agalactiae* using whole-genome sequence data. *Journal of clinical microbiology*, 54(5), 1388–1390. <https://doi.org/10.1128/JCM.03142-15>.
222. Shkromada, O., Pikhtirova, A., Tytikh, Ya., Baydevliatov, Yu., & Fotin, A. (2022). Treatment of subclinical mastitis of cows with probiotics. *Scientific Horizons*, 25(1), 30-40. [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(1\).2022.30-40](https://doi.org/10.48077/scihor.25(1).2022.30-40).
223. Shrestha, B., Neupane, R., Paudyal, S. (2024). Non-antibiotic management of mastitis in dairy cattle. *Texas A&M AgriLife Organic*. URL: <https://agrilifeorganic.org/2024/03/16/non-antibiotic-management-of-mastitis-in-dairy-cattle/>
224. Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Dhama, K., & Sharma, A. (2014). Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6, 49–58. doi:10.1016/j.bgm.2014.03.001.
225. Sinha, M.K., Thombare, N.N., & Mondal, B. (2014). Subclinical mastitis in dairy animals: incidence, economics, and predisposing factors. *The Scientific World Journal*, 2014, 523984. <https://doi.org/10.1155/2014/523984>.
226. Siyo, V., Schäfer, G., Hunter, R., Grafov, A., Grafova, I., Nieger, M., Katz, A.A., Parker, M.I., & Kaschula, C.H. (2017). The cytotoxicity of the ajoene analogue bispmb in whco1 oesophageal cancer cells is mediated by CHOP/GADD153. *Molecules*, 22(6), 892. <https://doi.org/10.3390/molecules 22060892>.
227. Song, X., Huang, X., Xu, H., Zhang, C., Chen, S., Liu, F., Guan, S., Zhang, S., Zhu, K., & Wu, C. (2020). The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. *Veterinary microbiology*, 247, 108757. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020. 108757>.
228. Sørensen, L.P., Madsen, P., Mark, T., & Lund, M.S. (2009). Genetic parameters for pathogen-specific mastitis resistance in Danish Holstein Cattle. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 3(5), 647–656. <https://doi.org/10. 017/ S1751731109003899>.
229. Sørensen, L.P., Mark, T.M. Sørensen, K., & Østergaard, S. (2010). Economic values and expected effect of selection index for pathogen-specific mastitis under Danish

conditions. *Journal of Dairy Science*, 93, 358–369. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2506>.

230. Sotirova, A., Spasova, D., Vasileva-Tonkova, E., & Galabova, D. (2009). Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*, 164(3), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.005>.

231. Štolcová, M., Řehák, D., Bartoň, L., & Rajmon, R. (2020). Blood biochemical parameters measured during the periparturient period in cows of Holstein and Fleckvieh breeds differing in production purpose. *Czech Journal of Animal Science*, 65(5), 172–181. doi: 10.17221/99/2020-CJAS.

232. Sudipa, Maity, & Kiran, Ambatipudi (2021). Response to Comments on «Mammary microbial dysbiosis leads to the zoonosis of bovine mastitis: a One-Health perspective» by Maity and Ambatipudi, *FEMS Microbiology Ecology*, 97, 8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab079>.

233. *Summary report on IDF Bull. 512/2021 World Dairy Situation. The complete document is available from the IDF.* URL: <https://fil-idf.org/world-dairy-situation-report-2021-2/>

234. Suprovych, T. M., Suprovych, M. P., Biriukova, O. D., Trach, V. V., Danchuk, O. V., & Grafov, A. V. (2022). BoLA-DRB3 gene as a marker of sensitivity of the white-headed Ukrainian cattle to mastitis. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 10(1), 3–10. <https://doi.org/10.32819/2022.10001>.

235. Suprovych, T. M., Suprovych, M. P., Mokhnachova, N. B., Biriukova, O. D., Strojansovska, L. V., & Chepurna, V. A. (2021). Genetic variability and biodiversity of Ukrainian Gray cattle by the BoLA-DRB3 gene. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(1), 33–41. <https://doi.org/10.15421/022106>.

236. Suprovych, T., Strojansovska, L., Vishchur, O., Havryliak, V., Vasylyuk, S., Masyuk, M., Solovodzinska, I., & Lubenets, V. (2023). Influence of liposomal thiosulfonate drug on the blood parameters of cows suffering catarrhal mastitis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(2), 195–202. <https://doi.org/10.15421/022329>.

237. Suprovych, T.M. Vishchur, O.I., Suprovych, M.P., & Chepurna, V.A. (2019). Relationship between alleles of gene BoLA-DRB3 and somatic cells amount in milk of Ukrainian black-and-white dairy breed. *The Animal Biology*, 21(4), 75–83. doi:10.

15407/animbio121.04. 075.

238. Suprovych, T.M., Suprovych, M.P., Koval, T.V., Karchevska, T.M., Chepurna, V.A., Chorny, I.O., & Berezhanskyi, A.P. (2018). BoLA-DRB3 gene as a marker of susceptibility and resistance of the Ukrainian black-pied and red-pied dairy breeds to mastitis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(3), 363-368. doi:10.15421/021853.

239. Susar, H., Çelebi, M., Çelebi, Ç., Çoban, Ö., Şen H., Karahan İ. (2023). The preparation of liposomal formulations of gentamicin and ceftiofur used in veterinary medicine. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(3), 554–559. <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1262051>.

240. Thomas V., Jong A., Moyaert H. et al. (2015). Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *International journal of antimicrobial agents*, 46(1), 13–20.

241. Todar, K. (2000). *Staphylococcus aureus and Staphylococcal disease*. In: Todar's Online Textbook of Bacteriology. Online Book. Kenneth Todar, Madison, Wisconsin. Available from: <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.

242. Tommasoni, C., Fiore, E., Lisuzzo, A., & Giancesella, M. (2023). Mastitis in dairy cattle: on-farm diagnostics and future perspectives. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(15), 2538. <https://doi.org/10.3390/ani13152538>.

243. Tong, X., Barkema, H. W., Nobrega, D. B., Xu, C., Han, B., Zhang, C., Yang, J., Li, X., & Gao, J. (2025). Virulence of bacteria causing mastitis in dairy cows: a literature review. *Microorganisms*, 13(1), 167. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010167/>

244. Tornquist, S. J., & Rigas, J. (2010). Interpretation of ruminant leukocyte responses. *Schalms Veterinary Hematology*. Weiss, D.J. and Wardrop, K.J. 6th ed. Wiley Blackwell, Iowa, USA, 307–313.

245. Trimboli, F., Ragusa, M., Piras, C., Lopreiato, V., & Britti, D. (2020). Outcomes from experimental testing of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) Administration during the transition period of dairy cows. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(10), 1832. <https://doi.org/10.3390/ani10101832>.

246. Trujano-Chavez, M. Z., Sánchez-Ramos, R., Pérez-Rodríguez, P., & Ruíz-

Flores, A. (2021). Genetic diversity and population structure for resistance and susceptibility to mastitis in Braunvieh cattle. *Veterinary sciences*, 8(12), 329. <https://doi.org/10.3390/vetsci8120329>.

247. United Nations. Department of Economic and Social Affairs Population. *Division World Population Prospects 2022*. URL: <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>

248. Vahedi, M., Nasrolahei, M., Sharif, M., & Mirabi, A.M. (2013). Bacteriological study of raw and unexpired pasteurized cow's milk collected at the dairy farms and super markets in Sari city in 2011. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 54(2), 120–123.

249. Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A. M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta veterinaria Scandinavica*, 59(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>.

250. Van Eijk, M.J.T., Stewart-Haynes, J.A., & Lewin, H.A. (1992). Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23(6), 483–496. doi: 10.1111/j.1365-2052.1992.tb00168.x.

251. Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2015). Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative Staphylococci associated with ruminants. *Veterinary journal* (London, England: 1997), 203(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.11.001>.

252. Vavilin V.A., Shintyapina A.B., Safronova O.G., Antontseva E.V., Mordvinov V.A., Nikishina M.V., Kandalintseva N.V., Prosenko A.E., & Lyakhovich V.V. (2014). Position of an active thiosulfonate group in new phenolic antioxidants is critical for ARE-mediated induction of GSTP1 and NQO1. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 6(4), 78–183.

253. Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L., & Laskin, J. D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *The Journal of biological chemistry*, 280(42), 35372–35381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503991200>.

254. Vissio, C., Dieser, S.A., Raspanti, C.G., Giraudo J.A., Bogni, C.I., Odierno, L.M., & Larriestra, A.J. (2012). Dairy herd mastitis program in Argentina: farm clusters and effects on bulk milk somatic cell counts. *Pakistan Veterinary Journal*, 33, 80–84.

255. Vlizlo, V., Prystupa, O., Slivinska, L., Gutyj, B., Maksymovych, I., Chernushkin, B., Leno, M., Rusyn, V., Shcherbatyy, A., & Lychuk, M. (2024). Treatment of cows with liver pathology using a liposomal drug based on extract from the fruits of *Silybum marianum*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 15(3), 429–435. doi:10.15421/022460.
256. Wagner, A., & Vorauer-Uhl, K. (2011). Liposome technology for industrial purposes. *Journal of drug delivery*, 591325. <https://doi.org/10.1155/2011/591325>.
257. Wanjala, G., Mathooko, F., Kutima, Mathara, J., & Wanjala, G.W. (2017). Microbiological quality and safety of raw and pasteurized milk marketed in and around Nairobi Region. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 17, 11518-11532. <https://doi.org/10.18697/ajfand.77.15320>.
258. Watters, Rick (2018). *A fresh look at the five-point mastitis control plan*: URL: <https://www.agproud.com/articles/31335-a-fresh-look-at-the-five-point-mastitis-control-plan>.
259. Wellnitz, O., & Bruckmaier, R.M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary journal* (London, England: 1997), 192(2), 148–152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>.
260. Werling, D., Piercy, J., & Coffey, T.J. (2006). Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? *Veterinary immunology and immunopathology*, 112(1-2), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.007>.
261. Wolff, C., Espetvedt, M., Lind, A.K., Rintakoski, S., Egenvall, A., Lindberg, A., & Emanuelson, U. (2012). Completeness of the disease recording systems for dairy cows in Denmark, Finland, Norway and Sweden with special reference to clinical mastitis. *BMC veterinary research*, 8, 131. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-131>.
262. Wolter, W., & Bonsels, T. (2013). Eutererkrankungen Kosten Viel Geld. *AID Infodienst Bonn*. URL: <http://www.aid.de/allg/impressum.php>.
263. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: WHO (2015).
264. Yin, B., Li, W., Qin, H., Yun, J., & Sun, X. (2021). The use of Chinese skullcap (*Scutellaria baicalensis*) and its extracts for sustainable animal production. *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(4), 1039. <https://doi.org/10.3390/ani11041039>.

265. Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2020). *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *Journal of applied microbiology*, 129(5), 1102–1119. <https://doi.org/10.1111/jam.14706>.
266. Zhao, X., & Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of animal science*, 86(13 Suppl), 57–65. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>.
267. Zigo, F., Vasil', M., Ondrašovičová, S., Výrostková, J., Bujok, J., & Pecka-Kielb, E. (2021). Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. *Frontiers in veterinary science*, 8, 607311. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.607311>.
268. Zilbeyaz, K., Oztekin, A., & Kutluana, E. G. (2021). Design and synthesis of garlic-related unsymmetrical thiosulfonates as potential Alzheimer's disease therapeutics: In vitro and in silico study. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 40, 116194. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116194>.

ДОДАТКИ

Додаток 1



(11) **151429**(19) **UA**

(51) МПК (2022.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 7/00
C12Q 1/68 (2018.01)

(21) Номер заявки: **u 2022 00379**(22) Дата подання заявки: **31.01.2022**(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **21.07.2022**(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня: **20.07.2022, Бюл. № 29**

(72) Винахідники:
Супрович Тетяна Михайлівна, UA,
Супрович Микола Петрович, UA,
Данчук Олексій Володимирович, UA,
Строяновська Лілія Василівна, UA

(73) Володілець:
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
 вул. Канатна, 99, м. Одеса,
 Одеська обл., 65039, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ СТІЙКОСТІ/СХИЛЬНОСТІ ДО МАСТИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ У РАНЬНЬОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗІ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб виявлення стійкості/схильності до маститу великої рогатої худоби у ранньому постнатальному онтогенезі, що включає аналіз лімфоцитарних антигенів та алелів ДНК, як маркерів для прогнозування чутливості теличок до маститів до постановки в робоче стадо, який **відрізняється** тим, що визначають генетичні маркери на основі лімоцитарних антигенів I класу та алелі екзона 2 гена BoLA-DRB3 II головного комплексу гістосумісності та встановлюють генетичний статус тварини на основі інтегральної оцінки за статистичною моделлю.

Додаток 2

АКТ

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. Назва впровадження: комплексний ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату (ЕТС)

2. Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР: Імунобіологічна реактивність організму корів із клінічним та субклінічним запальним процесом молочної залози за дії ліпосомального препарату, 0124U002297

3. Підрозділ установи – розробника: кафедра гігієни тварин та ветеринарного забезпечення Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

Коротка характеристика впровадження: Коровам української чорно-рябї молочної породи (2-3) лактація, хворим на субклінічний мастит внутрішньом'язово тричі з інтервалом 24 години вводили комплексний ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату (ЕТС) дозою 20 мл на тварину. Впродовж всього періоду лікування проводили контроль за клінічним станом тварин та визначали ефективність лікарського засобу. Впродовж всього періоду лікування проводили контроль за клінічним станом тварин та визначали ефективність лікарського засобу.

5. Назва організації, де проведено впровадження: ТОВ НВА «Перлина Поділля» Шепетівського району Хмельницької області.

6. Рік та обсяг впровадження: Березень 2022 року – квітень 2023 року. 10 голів.

7. Результати впровадження: Отримані данні свідчать, що внутрішньо м'язове введення коровам хворих на субклінічну форму маститу ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату забезпечує високу терапевтичну ефективність, яка становила 100%.

8. Відповідальні за впровадження:

Від розробника:

Лілія СТРОЯНОВСЬКА, аспірантка
кафедра гігієни тварин та ветеринарного
забезпечення НПУ ЗВЗ «ПДУ»

ТОВ НВА «Перлина Поділля»

Шепетівського району

Хмельницької області

Валерій Валерійович Мельник,

лікар ветеринарної медицини



20 грудня 2023 р.

Додаток 3

АКТ

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** комплексний ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату (ЕТС)
2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** Імунобіологічна реактивність організму корів із клінічним та субклінічним запальним процесом молочної залози за дії ліпосомального препарату, 0124U002297
3. **Підрозділ установи – розробника:** кафедра гігієни тварин та ветеринарного забезпечення Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».
4. **Коротка характеристика впровадження:** Коровам української чорно-рябої молочної породи (2-3) лактація, хворим на клінічний мастит внутрішньом'язово тричі з інтервалом 24 години вводили комплексний ліпосомальний препарат на основі етилтіосульфанілату (ЕТС) дозою 20 мл на тварину. Впродовж всього періоду лікування проводили контроль за клінічним станом тварин та визначали ефективність лікарського засобу. Впродовж всього періоду лікування проводили контроль за клінічним станом тварин та визначали ефективність лікарського засобу.
5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Фермерське господарство «Подільська марка» Кам'янець-Подільського району Хмельницької області.
6. **Рік та обсяг впровадження:** Березень 2022 року – квітень 2023 року. 10 голів.
7. **Результати впровадження:** Отримані данні свідчать, що внутрішньо м'язове введення коровам хворих на клінічну форму маститу ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату забезпечує високу терапевтичну ефективність, яка становила 92%.

8. Відповідальні за впровадження:

Від розробника:

Лілія СТРОЯНОВСЬКА, аспірантка
кафедра гігієни тварин та ветеринарного
забезпечення НПУ ЗВЗ «ПДУ»

Від ФГ «Подільська марка»

Кам'янець-Подільського району

Хмельницької області

Юрій БЛАЖЕСВ, лікар ветеринарної медицини



«12» грудня 2023 р.

Додаток 4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної та
методичної роботи Одеського
державного аграрного університету

Ірина МАЛЕЦЬКА

« » 2025 р.

А К Т

**про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес**

Дійсним актом підтверджується, що результати дисертаційної роботи аспірантки Строяновської Лілії Василівни на тему: «Імунобіологічна реактивність організму корів із запальним процесом молочної залози за дії ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату» виконана на кафедрі гігієни тварин та ветеринарного забезпечення Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет», м. Кам'янець – Подільський впроваджено в навчальний процес на кафедрі хірургії, акушерства та хвороб дрібних тварин факультету ветеринарної медицини.

1. Вид впровадження результатів: використання альтернативного методу лікування корів хворих на клінічний та субклінічний мастит за допомогою комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату.

2. Форма впровадження: наповнення лекційного матеріалу та практичних кейсів щодо терапевтичної ефективності лікування корів з запальним процесом молочної залози ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату.

3. Новизна результатів науково-дослідних робіт: Одержано нові дані стосовно впливу нового комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на гематологічний та біохімічний профіль крові, клітинні і гуморальні фактори природнього і адаптивного імунітету за умов застосування коровам хворим на катаральний і субклінічний мастит.

Доведено нормалізуючий вплив емульсії ліпосомального препарату дозою 0,04 мл/кг маси тіла тварини (з вмістом ЕТС 1,25%) на активність ензимів

антиоксидантного захисту та вміст продуктів перекісного окиснення ліпідів і окисної модифікації протеїнів, активність показників неспецифічної резистентності та імунокомпетентних клітин в крові хворих на катаральний і субклінічний мастит корів.

4. Перелік курсів і дисциплін у рамках яких запроваджено результати дисертаційного дослідження:

– по кафедрі хірургії, акушерства та хвороб дрібних тварин (спеціальність 211 ветеринарна медицина) – Акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин, Ветеринарне акушерство, гінекологія та андрологія, Гінекологічні хвороби та андрологія продуктивних тварин.

5. Соціальний ефект: підвищення якості освіти та ознайомлення майбутніх лікарів ветеринарної медицини з альтернативним сучасним методом лікування корів хворих на катаральний і субклінічний мастит новим комплексним ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату, терапевтична ефективність якого при клінічній формі маститу складає 90%, а при субклінічній – 100%. Застосування ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату дозволяє скоротити термін одужання корів, що матиме значний економічний ефект.

**В.о. завідувача кафедри хірургії,
акушерства та хвороб дрібних тварин
кандидат ветеринарних наук, доцент**



Микола МОРОЗОВ

Додаток 5

Погоджено
Проректор з науково-педагогічної роботи
та розвитку, д. с-г. н., професор,
академік НААН України


Сергій КВАША
«__» _____ 2025 р.

Затверджую
Проректор з наукової роботи та
інноваційної діяльності,
д. с-г. н., доцент


Оксана ТОНХА
«__» _____ 2025 р.



А К Т

про впровадження / використання результатів
дисертаційної роботи у освітній процес

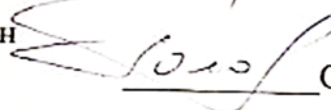
Цим актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Імунобіологічна реактивність організму корів із запальним процесом молочної залози за дії ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – Ветеринарна медицина, виконаної Строяновською Лілією Василівною, впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни: «Акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», розділи якої доповнені новими даними про використання альтернативного сучасного методу лікування корів хворих на катаральний і субклінічний мастит новим комплексним ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату, терапевтична ефективність якого при клінічній формі маститу складає 90%, а при субклінічній – 100%.

Результати дисертаційної роботи Строяновської Лілії Василівни щодо імунобіологічної реактивності організму корів із запальним процесом молочної залози за дії ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату використовуються при читанні лекцій та веденні лабораторних занять на кафедрі ветеринарної репродуктології Національного університету біоресурсів і природокористування України, у підготовці фахівців ОС «Магістр» (галузь знань 21 – Ветеринарна медицина, спеціальність 211 – Ветеринарна медицина).

Декан факультету ветеринарної
медицини, д.б.н., професор,
академік НААН України


Микола ЦВІЛІХОВСЬКИЙ

Директор НДІ здоров'я тварин
д.вет.н., професор


Сергій ГОЛОПУРА

Завідувач кафедри
ветеринарної репродуктології,
к.вет.н., доцент


Олександр ВАЛЬЧУК

Додаток 6

ПОГОДЖЕНО

Проректор з наукової роботи
Львівського національного університету
Ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького

 О. М. ФЕДЕЦЬ
2024 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і
технологічних робіт в освітній процес закладів вищої освіти

Дійсним актом підтверджується, що результати науково-дослідної роботи:
дисертаційної роботи аспірантки Строяновської Лілії Василівни на тему:
«Імунобіологічна реактивність організму корів із запальним процесом молочної
залози за дії ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату»
виконаної на кафедрі гігієни тварин та ветеринарного забезпечення
Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний
університет», м. Кам'янець – Подільський.
впроваджено в навчальний процес на кафедрі акушерства, гінекології та
біотехнології відтворення тварин ім. Г.В. Зверєвої ЛНУВМД імені С.З.
Гжицького

1. Вид впровадження результатів: використання альтернативного методу
лікування корів хворих на клінічний та субклінічний мастит за допомогою
комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату.
Результати дисертаційної роботи в Строяновської Л. В. впроваджено в
навчальний процес ЛНУВМД імені С.З. Гжицького.

2. Форма впровадження: наповнення лекційного матеріалу та практичних
кейсів щодо терапевтичної ефективності лікування корів з запальним процесом
молочної залози ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату.

3.Новизна результатів науково-дослідних робіт: Одержано нові дані стосовно впливу нового комплексного ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату на гематологічний та біохімічний профіль крові, клітинні і гуморальні фактори природнього і адаптивного імунітету за умов застосування коровам хворим на катаральний і субклінічний мастит.

Доведено нормалізуючий вплив емульсії ліпосомального препарату дозою 0,04 мл/кг маси тіла тварини (з вмістом ЕТС 1,25%) на активність ензимів антиоксидантного захисту та вміст продуктів перекісного окиснення ліпідів і окисної модифікації протеїнів, активність показників неспецифічної резистентності та імунокомпетентних клітин в крові хворих на катаральний і субклінічний мастит корів.

4. Перелік курсів і дисциплін у рамках яких запроваджено результати дисертаційного дослідження:

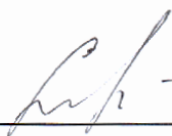
– по кафедрі акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин ім. Г.В. Зверєвої (спеціальність 211 ветеринарна медицина) – Акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин.

5. Соціальний ефект: підвищення якості освіти та ознайомлення майбутніх лікарів ветеринарної медицини з альтернативним сучасним методом лікування корів хворих на катаральний і субклінічний мастит новим комплексним ліпосомальним препаратом на основі етилтіосульфанілату, терапевтична ефективність якого при клінічній формі маститу складає 90%, а при субклінічній – 100%. Застосування ліпосомального препарату на основі етилтіосульфанілату дозволяє скоротити термін одужання корів, що матиме значний економічний ефект.

Завідувач кафедри акушерства,
гінекології та біотехнології

відтворення тварин ім. Г.В. Зверєвої

професор, доктор вет. наук



В.Ю. Стефаник