

АНОТАЦІЯ

Кириченко В.В. Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». – Одеський державний аграрний університет МОН України, Одеса, 2024.

Експерименти кваліфікаційної праці проведено з 2020 до 2024 рр. на кафедрі фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету. В досліді були залучені породисті та помісні собак у яких відбирали кров в різні фази статевого циклу та в анестральний період для визначення показників функціонального стану ендокринної та імунної системи. Також для дослідження особливостей поширення дисфункцій статевого циклу у собак за різних зовнішніх та внутрішніх чинників був проведений аналіз статистичних даних клінічного обстеження собак у ветеринарних клініках м. Одеси. Імуногістохімічні та морфологічні показники тканини матки досліджувались після оваріогістероектомії з використанням моноклональних антитіл до основних CD рецепторів місцевого імунітету та прогестерону. Проведені дослідження надали можливість отримати нові наукові дані щодо впливу віку, розміру, умов утримання та сезону року на поширення дисфункцій репродуктивних органів у сук. Встановлена залежність відсотку поширення дисфункцій залежно від віку. Так, у сук до 2-х років лише в 12,2 % випадків серед інших дисфункцій встановлювали неплідність, проти 39,0% – в зрілому віці та 48,8% – в старшому (після 6 років) віці. Також найменший відсоток встановлений і серед сук віком до 2-х років, у яких виявлена піометра (19,3%) та кістозні утворення в яєчниках та матці (13,2%). При цьому слід зазначити, що серед сук до 2-х років частіше, ніж в дорослому віці (від 2-х то 6 років), встановлювали дисфункції, пов'язані с ациклією або поліциклією, кількість таких тварин

становила 34,1%. Серед сук великих розмірів частіше всього (46,2%) діагностується кістозне переродження матки та яєчників, проте неплідність та ациклічні і поліциклічні статеві цикли у цієї групи тварин є найменшими. У сук маленьких розмірів в 61,5% серед інших груп тварин встановлено випадки піометри, проте як у собак середніх розмірів – лише 13,5%, що в 4,6 разів менше. Також прояв ациклії та поліциклії в 50% випадків був встановлений у сук дрібних порід, в той час як у сук великих порід цей відсоток становив лише 15,9%. Прояв піометри також частіше реєструється у сук в умовах квартири (65,1%) порівнянно з утриманням в приватних будинках (34,9%). У 2,5 рази випадки ациклії та поліциклії та в 3,0 рази кістозного переродження матки і яєчників частіше спостерігаються у сук за квартирного утримання. В середньому за квартирного способу утримання у сук прояв дисфункцій становить 68,3%, а за утримання в умовах приватного будинку – 31,7%. У літній період у сук в 37,4% діагностуються кісти на яєчниках та в матці, що супроводжується ациклічними та поліциклічними статевими циклами на рівні 29,5%. В літній період року лише у 17,1% тварин встановлено неплідність, проте ця кількість була вищою на 36,6% у зимовий період. За осінній період найбільше вираженим був прояв ациклічних та поліциклічних статевих циклів – 33,0%, що є найбільшим показником порівняно з іншими сезонами року.

Результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів (ФАН), абсолютної кількості лейкоцитів (АКЛ), нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів протягом статевого циклу показали, що здатність нейтрофілів до фагоцитозу на 5-ту добу-естрального циклу збільшилася на 13% ($p < 0,05$) порівняно з першим днем. Протягом статевого циклу динаміка абсолютної кількості лейкоцитів відзначилася тенденцією до зниження на 21%. Проте популяції різних клітин мали неоднакову закономірність. Так, на фоні загальної тенденції зниження АКЛ, на 5 добу вміст нейтрофілів мав тенденцію до збільшення, а лімфоцитів – до

зменшення. Також в незначній мірі встановлено зменшення популяції моноцитів. На 10-ту добу еструсу, тенденцією до зниження відзначилися всі популяції досліджуваних клітин, а на 15-ту добу кількість лімфоцитів збільшується на 13%, за тенденції до нижчого рівня нейтрофілів. На відміну від Т- та В лімфоцитів, природні клітини-кілери, які відображають вроджений клітинний імунітет, позначилися тенденцією до зниження протягом фолікулярної фази статевого циклу (перші 10 діб).

Дослідженнями клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу, залежно від віку та сезону року встановлено, що фагоцитарна активність нейтрофілів протягом циклу в молодих собак мала тенденцію до зниження, з $3,38 \pm 0,84$ Г/л на 1-у добу циклу до $2,11 \pm 0,56$ Г/л на 20-ту добу. У тварин віком від 2-х до 6-ти років з 1-ої по 5-ту добу цей показник мав тенденцію до збільшення, а при подальшому аналізі – знижувався. У крові сук від 2-х до 6-ти років життя з 10-ї до 15-ї доби статевого циклу встановлена тенденція до збільшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів, в подальшому (до 25-ї доби) – спостерігали тенденцію до зменшення. Більше виражені зміни кількості лімфоцитів на 25-ту добу стосувалися, Т-хелперних клітин та НК-лімфоцитів. Достовірна різниця між групами на 25-ту добу становила 27% ($p < 0,001$) для Т-хелперів та 29% ($p < 0,001$) – для НК-лімфоцитів.

Отримані нові дані щодо клітинної ланки імунітету у сук за різного стану репродуктивної системи. Так, порівнюючи абсолютну кількість лейкоцитів встановлено, що в анеструсі цей показник становив $5,86 \pm 0,89$ Г/л порівняно з $5,43 \pm 1,53$ Г/л в період статевої охоти та $5,68 \pm 0,08$ Г/л – за піометри. Показник АКЛ був достовірно ($p < 0,05$) меншим в групі сук з піометрою і становив $1,48 \pm 0,35$ Г/л, що на 0,92 Г/л менше порівняно з групою тварин в анестральний період. Аналіз динаміки вмісту прогестерону протягом статевого циклу у сук показав, що на 1-у добу циклу в середньому концентрація відповідного показника

становила $2,13 \pm 0,11$ нмоль/л, що є характерним для анеструсу. Протягом наступних 5-ти діб відмічене незначне збільшення вмісту прогестерону – до $3,27 \pm 0,69$ нмоль/л. На 10-у добу еструсу вміст прогестерону достовірно збільшився ($P \leq 0,05$) до $6,48 \pm 0,54$ нмоль/л. Варто відзначити, що така концентрація характерна для початкової стадії лютеїнової фази статевого циклу. Дослідження концентрації прогестерону в сироватці крові на п'ятнадцяту добу статевого циклу відзначилася його значним (в 16 разів) достовірним ($P \leq 0,05$) збільшенням в порівнянні з 10-ою добою. Тенденція до збільшення концентрації зберіглася і в наступні 5 діб спостереження, і вже на 20-ту добу відповідний показник становив $299,3 \pm 10,87$ нмоль/л ($P \leq 0,05$). Після 20-ї доби статевого циклу відмічено зниження концентрації в сироватці крові прогестерону, а на 25-ту добу зменшення відбулося до $202,80 \pm 0,76$ нмоль/л.

У результаті проведених досліджень запропоновано спосіб прогнозування розвитку дисфункцій репродуктивних органів у сук залежно від ступеня стресованості організму, який включає визначення відсотку інверсії Т-«активних» лімфоцитів під час навантаження (*in vitro*) нейромедіатором адреналіном. Для зниження ризику виникнення запальних процесів у матці після статевого циклу обов'язковим є визначення показників клітинної ланки імунітету і фагоцитарної активності нейтрофілів.

Ключові слова: статевий цикл, собаки, прогестерон, естрадіол, кортизол, лімфоцити, CD 4, CD 8, фагоцитарна активність нейтрофілів, кров, імунна система.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА:

Основні наукові результати дисертації:

- *Статті у наукових фахових виданнях України:*

1. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка статевих стероїдних гормонів, кортизолу та трийодтиронину у собак за естрального циклу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 104, 18-25. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.104.03> (особистий внесок - аспірантка самостійно провела аналіз літературних джерел з напрямку досліджень, представлених в науковій статті, відбрала проби крові та самостійно визначила вміст гомонів в сироватці крові)

2. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка відносних показників імунограми у сук за еструсу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 105, 5-12. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.105.01> (особистий внесок – здобувачка провела пробовідбір зразків крові та визначила відносний вміст лімфоцитів та їх імунорегуляторних субпопуляцій, а також провела аналіз наукової літератури з зазначеного напрямку)

3. Брошков, М.М., & Кириченко, В.В. (2023). Стан клітинної ланки імунітету та вміст стероїдних гормонів у сук за різного стану репродуктивної системи. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*, 25(112), 175-180. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11228>. (особистий внесок – аспірантка провела порівняльний аналіз отриманих даних з іншими літературними джерелами, відпрацювала методіку визначення вмісту гормонів в сироватці крові та сформувала мету досліджень)

4. Кириченко, В.В. (2023). Поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від віку, розміру, умов утримання та сезону року. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 109, 110-116. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2023.109.17> (особистий внесок – аспірантка самостійно проаналізувала амбулаторні журнали ветеринарних клінік та систематизувала отримані дані залежно від віку, умов утримання, розміру та періоду року, а також побудувала графіки та сформувала висновки)

- *Статті у наукових виданнях інших держав:*

5. Broshkov, M.M., & Kyrychenko, V.V. (2023). Dynamics of progesterone, estradiol, cortisol, triiodothyronine and indicators of adaptive immunity concentrations in female dogs during estrus. *Journal of Biometry Studies*, Vol. 3(1), 2-11. <https://doi.org/10.29329/JofBS.2023.501.03> (особистий внесок – провела аналіз наукових джерел з даного напрямку за останні п'ять років та порівняння їх з отриманими даними в результаті власних досліджень, сформовано самостійно мету досліджень та висновки)

- *Монографії:*

6. Broshkov, M., Fedkalova, T., Kyrychenko, V. & Kot V. (2022). *Methods for regulation of immune reactivity in dogs*. OSAU (особистий внесок – приймала участь у дослідженнях пов'язаних з визначенням вмісту статевих стероїдів в організмі сук та показників клітинної ланки імунітету, проаналізувала літературні джерела з вказаного напрямку)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

- *Тези наукових доповідей на конференціях та конгресах:*

7. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 12-13 жовтня). Динаміка статевих стероїдних гормонів та кортизолу у собак за естрального циклу. *Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присв. 35-річчю заснування факультету вет. медицини (с.68-70)*. Поліський національний університет. <https://polissiauniver.edu.ua/wp-content/uploads/2022/11/Збірник-праць-до-35-річчя-факультету-ветеринарної-медицини.pdf> (особистий внесок – самостійно провела лабораторні дослідження сироватки крові на вміст гормонів, написала тези та відповідно сформулировала висновки)

8. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 8-12 грудня). Динаміка показників імунограм у сук за еструсу. *Актуальні аспекти розвитку науки і освіти: зб. тез доп. II міжнар. наук.-практ. конф. НПП та молодих науковців. (с.73-76)*. Одеський державний аграрний університет. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2023/01/Zbirnuk_II_Mignarodnoi_nauk-prakt_konferencii_8-9.12.pdf (особистий внесок – самостійно провела відбір проб та лабораторні

дослідження плазми крові, проаналізувала динаміку показників клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу)

9. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2023, 31 січня). Концентрація прогестерону, естрадіолу, кортизолу, трийодтироніну та показників клітинної ланки адаптивного імунітету у сук за піометри. *Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Євразії*: зб.наук.праць. III міжнар. наук.-практ.інтернет-конф. (с. 14-16). **Університет Григорія Сковороди в Переяславі**. <http://conferences.neasmo.org.ua/uk/art/7189> (особистий внесок – провела діагностування дисфункції у сук, відібрала проби крові та приймала участь у оперативному втручанні під час оваріогістероектомії, також були сформовані самостійно мета та результати досліджень)

10. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 9-11 листопада). Динаміка показників клітинної ланки імунітету та прогестерону у сук за естрального циклу. *Молодіжна наука заради миру та розвитку*: зб. Мат. I Міжнар. Наук.-пр. конф. (с. 44-47). Чернівецький національний університет. ім. Ю. Федьковича. https://drive.google.com/drive/folders/1pkUUKn_HQeBSnkueerSCvn6MdEDFw3Bo (особистий внесок – самостійно провела лабораторні дослідження сироватки та плазми крові, проаналізувала динаміку серологічних та імунологічних показників протягом статевого циклу).

11. Кириченко, В.В., Брошков, М.М., & Найда, В.В. (2023, 14-15 вересня). Динаміка імунофізіологічних показників у сук протягом естрального циклу залежно від віку. *Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах Євроінтеграції*: зб. Мат. Міжнар. Наук.-пр. конф. наук.-пед.працівників та молод.науковців. (с. 86-88). Одеський державний аграрний університет. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/01/Progr_Mizhnarodnoyi-konf-FVM_85-2023.pdf (особистий внесок – самостійно провела відбір проб крові у сук протягом статевого циклу, визначила показники клітинної ланки імунітету з врахуванням віку. Провела аналіз літературних джерел з вказаного напрямку та сформулювала висновки).

12. Кириченко, В.В., Брошков, М.М., & Найда, В.В. (2023, 9-10 листопада). Динаміка імунофізіологічних показників у сук протягом естрального циклу

залежно від сезону року. *Актуальні аспекти розвитку освіти і науки*: зб. Мат. III Міжнар. Наук.-пр. конф. наук.-пед.працівників та молод.науковців. (с. 60-61). Одеський державний аграрний університет.
https://drive.google.com/file/d/1ViB68uhzkYjDm2B2IYiOsyqs_gAhmOwg/view
(особистий внесок – самостійно провела відбір проб крові у сук протягом статевого циклу, визначила показники клітинної ланки імунітету з врахуванням сезону року та систематизувала отримані дані в таблиці. Провела аналіз літературних джерел з вказаного напрямку та сформулювала висновки).

ABSTRACT

Kyrychenko V.V. Immune status at different levels of sex hormones in dogs' organism. – Qualification scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the PhD degree in the subject area 211 “Veterinary medicine”. – Odesa State Agrarian University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Odesa, 2024.

Qualification work experiments were conducted from 2020 to 2024 at the department of physiology, pathophysiology and biochemistry of Odesa State Agrarian University. Purebred and domestic dogs were involved in the experiments. Blood of these dogs was collected in different phases of the sexual cycle and in the anestrus period. It was made to determine indicators of the functional state of the endocrine and immune systems. Also, statistical data analysis of clinical examination of dogs in veterinary clinics of Odesa was carried out to study the peculiarities of the distribution of sexual cycle dysfunctions in dogs due to various external and internal factors. Immunohistochemical and morphological indicators of uterine tissue were studied after ovariectomy using monoclonal antibodies to the main CD receptors of local immunity and progesterone.

The conducted researches provided an opportunity to obtain new scientific data on the influence of age, size, housing conditions and season of the year on the prevalence of dysfunctions of reproductive organs in bitches. The dependence of the distribution of dysfunctions depending on age has been established. Thus, among bitches up to 2 years of age, infertility was established in only 12.2% of cases among other dysfunctions, this indicator was 39.0% in adulthood and 48.8% in older (after 6 years old) age. Also, the lowest percentage was established among bitches under 2 years of age with pyometra (19.3%) and cystic formations in the ovaries and uterus (13.2%). At the same time, it should be noted that dysfunctions associated with acyclicity or polycyclicity were diagnosed more often among bitches under 2 years of age than in adults (from 2 to 6 years). The percentage of such animals was 34.1%. Among large-sized bitches, cystic degeneration of the uterus and ovaries is most often diagnosed (46.2%). However, infertility and acyclic and polycyclic sexual cycles are the least common in

this group of animals. Pyometra cases were found in 61.5% of small bitches, but only 13.5% in medium-sized dogs, which is 4.6 times less. Also, the manifestation of acycilia and polycycilia in 50% of cases was established in bitches of small breeds, while in bitches of large breeds this percentage was only 15.9%. Manifestation of pyometra is also more often registered in bitches in apartment conditions (65.1%) compared to keeping in private houses (34.9%). Cases of acycilia and polycycilia and cystic degeneration of the uterus and ovaries are 2.5 and 3.0 times respectfully more frequent in bitches kept in apartments. On average, the manifestation of dysfunctions is 68.3% in apartment housing and 31.7% - in private housing. In summer, 37.4% of bitches were diagnosed with ovarian and uterine cysts, and 29.5% had acyclic and polycyclic sexual cycles. In the summer period of the year, only 17.1% of animals were found to be sterile, but 36.6% - in the winter period. For the autumn period, the manifestation of acyclic and polycyclic sexual cycles was the most pronounced, in this period the relative number of such animals was 33.0%, which is the largest indicator compared to other seasons of the year.

The results of the phagocytic activity of neutrophils (FAN), the absolute leukocyte count (ALC), neutrophils, lymphocytes and monocytes study during the sexual cycle showed that the ability of neutrophils to phagocytosis changed during the estrous cycle by 13% ($p < 0.05$) on the 5th day, compared to the first day. During sexual cycle, the dynamics of the ALC tended to decrease on 21%. However, the populations of different cells had different regularities. Thus, on the background of the general trend of ALC decreasing, on the 5th day the content of neutrophils tended to increase, and lymphocytes - to decrease. A slight decrease in the monocyte population was also found. On the 10th day of estrus, all the populations of the studied cells had a tendency to decrease, and on the 15th day, the number of lymphocytes increased by 13%, and the tendency of the decrease in neutrophils remained. Unlike T and B lymphocytes, natural killer cells, which reflect innate cellular immunity, tended to decrease in dynamics during the follicular phases of the sexual cycle (first 10 days).

Studies of the cellular link of immunity in bitches during the sexual cycle, depending on age and season of the year, proved that the phagocytic activity of

neutrophils during the cycle in young dogs had a tendency to decrease, from 3.38 ± 0.84 G/l on the 1st day of the cycle – to 2.11 ± 0.56 G/l on the 20th day. In animals aged from 2 to 6 years, from the 1st to the 5th day, this indicator had a tendency to increase, and during further analysis, it decreased. In bitches' blood from 2 to 6 years old, from the 10th to the 15th day of the sexual cycle, a tendency to increase the absolute number of T-lymphocytes was observed. Later (up to the 25th day), there was a tendency to decrease. More pronounced changes in the number of lymphocytes on the 25th day were related to T-helper cells and NK lymphocytes. Reliable difference between groups on the 25th day was 27% ($p < 0.001$) for T-helpers and 29% ($p < 0.001$) –for NK lymphocytes.

New data were obtained regarding the cellular link of immunity in bitches with different states of the reproductive system. Thus, comparing the absolute number of leukocytes, it was established that in anestrus this indicator was 5.86 ± 0.89 G/l in comparison with 5.43 ± 1.53 G/l in the period of sexual desire and 5.68 ± 0.08 G/l – in conditions of pyometra. The indicator of the absolute number of lymphocytes was reliably ($p < 0.05$) lower in the group of bitches with pyometra and was 1.48 ± 0.35 G/l, which is 0.92 G/l less compared to the group of animals in the anestrus period. Analysis of the dynamics of progesterone content during the sexual cycle in bitches showed that on the 1st day of the cycle, its concentration was on average 2.13 ± 0.11 nmol/L, which is characteristic of anestrus. During the next five days, a slight increase in progesterone content was noted (up to 3.27 ± 0.69 nmol/L). On the 10th day of estrus, the hormone content increased reliably ($P \leq 0.05$) up to 6.48 ± 0.54 nmol/L. This concentration is typical for the initial stage of the luteal phase of estrus. Determination of progesterone concentration in blood serum on the 15th day of estrus showed a significant (16-fold) reliable ($P \leq 0.05$) increase compared to the 10th day. The tendency to increase the concentration was saved in the next five days of observation and already on the 20th day this indicator was 299.3 ± 10.87 nmol/L ($P \leq 0.05$). After the 20th day of estrus, we note a decrease in progesterone serum concentration, and already on the 25th, it decreased to 202.8 ± 0.76 nmol/L.

A method of predicting the development of dysfunctions of reproductive organs in bitches depending on the degree of body stress is proposed. It includes determining the percentage of inversion of T-"active" lymphocytes during addition (in vitro) of adrenaline. To reduce the risk of inflammatory processes in the uterus after the sexual cycle, it is necessary to determine the indicators of the cellular link of immunity and the phagocytic activity of neutrophils.

Key words: sexual cycle, dogs, progesterone, estradiol, cortisol, lymphocytes, CD 4, CD 8, phagocytic activity of neutrophils, blood, immune system.