

профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят, поросят/ А.Г. Шахов// Ветеринарная патология.- 2003.- N2(6). – С. 25-28. 5. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea/ S.J Elliot, A.W. Paton, J.C.Paton// Jbid.-2001.-V.69.- P. 6651 -6659.

УДК 619:615.361:611.018.46:636.028

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ОЦЕНКЕ АКТИВНОСТИ ВАКЦИН ПРОТИВ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Бусол В.А., Костенко С.А., Тонская Т.Г., Драгулян М.В.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина

Проведено изучение влияния иммуногенов вируса лейкоза крупного рогатого скота на цитогенетические показатели костного мозга в динамике иммуногенеза. Метод цитогенетических исследований клеток костного мозга белых мышей целесообразно использовать для оценки безопасности, а также иммуногенных свойств специфических препаратов ретровирусного происхождения.

In this article presents results on the effect of immunogens leukemia virus in cattle on cytogenetic indices of bone marrow in immunogenesis. The method of cytogenetic studies of bone marrow cells of white mice should be used to assess the safety, as well as immunogenic properties of specific drugs retroviral origin.

Введение. В последнее время исследователи уделяют особое внимание изучению кариопатического действия вакцинных препаратов, которые вызывают в организме увеличение количества клеток с цитогенетическими сдвигами [0,0,0,0]. Согласно концепции Ф.Бернета, такого рода изменения в иммунокомпетентных клетках играют важную роль в процессе формирования клонов иммуноцитов в костном мозге, которые составляют основную массу В-лимфоцитов и их предшественников [0]. В процессе иммуностимуляции перестраивается по-особому В-система иммунитета организма [0]. В основном органе формирования клеток крови – костном мозге, при условии активного действия антигена и составных вакцинных препаратов могут возникать кратковременные или продолжительные структурные изменения генома иммунокомпетентных клеток на ранних этапах их развития [0]. При действии определенных вакцин на культуры клеток (in vitro) увеличивается частота митозов и клеток с округлыми и патологическими ядрами, а также с наличием других изменений [0,0].

Анализ данных литературы свидетельствует об отсутствии использования метода оценки цитогенетических изменений лимфоидных клеток костного мозга, первичного органа кроветворения, под действием иммуногенов ретровирусного происхождения.

Целью наших исследований было изучить влияние иммуногенов вируса лейкоза крупного рогатого скота, как представителя ретровирусов, на цитогенетические показатели костного мозга мышей в динамике развития иммуногенеза и оценить целесообразность использования этого метода в вакцинологии ретровирусной инфекции.

Материалы и методы. Для определения цитогенетических изменений в иммунокомпетентных клетках костного мозга под воздействием инактивированных вакцин против лейкоза крупного рогатого скота использованные сконструированные нами иммуногены – «Профилейк 3» и «Профилейк 4», которые отличаются методологическим подходом конструирования. Опыт проводили на трех группах белых мышей (по 15 гол. в каждой). Каждому животному опытных групп вводили соответствующие вакцины в дозе 0,1 см³ двукратно с интервалом 7 дней. Животные контрольной группы оставались интактными. Цитогенетические исследования клеток костного мозга бедренной кости проводили по методике [0] на 7-ой, 14-ый, 30-ый и 60-ый день после первого введения иммуногена. При оценке цитогенетических изменений учитывали видовой набор хромосом (2n), наличие клеток с микроядрами (МЯ), двумя ядрами (ДЯ) и с признаками апоптоза (АП), а также определяли митотический индекс (МИ). Оценку изменений проводили на 3000 клетках. Расчет частоты метафаз (%) с хромосомными aberrациями (ХА) определяли в соответствии с общим количеством метафазных пластинок.

Результаты. В период опыта (60 дней) экспериментальные животные оставались клинически здоровыми и не отличались по физиологическому состоянию и поведению от мышей контрольной группы. У мышей на месте введения иммуногенов и изотонического раствора натрия хлорида изменений не обнаружено.

При оценке цитогенетических характеристик клеток установлено, что под действием обеих инактивированных вакцин против лейкоза крупного рогатого скота у большинства иммуноцитов красного костного мозга мышей опытных и контрольных групп сохранялся нормальный видовой набор хромосом (2n=40) в течение всего периода эксперимента.

Как видно по данным таблицы, у мышей, иммунизированных вакциной «Профилейк 3» на 7 день в костном мозге, по сравнению с животными контрольной группы, увеличивалось количество клеток с МЯ в 1,8 раза, метафаз с ХА – в 47,2, а МИ – 1,4 раза. В то же время уменьшалось количество ДЯ клеток в 1,6 раза и АП – в 2,2 раза. Функция костного мозга мышей второй группы изменялась в другом направлении. На 7 день после инокуляции вакцины «Профилейк 4» увеличилось количество клеток с МЯ в 3,3 раза и метафаз с ХА – в 34,9, а МИ в 1,5 раза. В отличие от мышей, привитых первым иммуногеном при введении второго, – количество ДЯ клеток в костном мозге не уменьшалось, а увеличивалось в 2,2 раза и оставалось почти на одинаковом уровне до конца эксперимента. Такие различия могут быть обусловлены структурой иммуногена.

В конструировании препарата «Профилейк 4» носитель антигена был меньших размеров, что влияло на функцию костного мозга по количественным показателям клеток апоптозной группы. В полях зрения исследуемых препаратов из костного мозга мышей второй группы на начальном этапе опыта не обнаруживали клетки в состоянии апоптоза.

Первое исследование клеток костного мозга показало, что у большинства мышей обеих опытных групп в делящихся клетках костного мозга состояние слипания хромосом развивалось у 0,83±0,4% от МИ, что

коррелировало с АП и гигантскими клетками, соответственно, $r=0,52$ и $r=0,58$ при $0,95 < P < 0,99$. Однако количество гигантских клеток не превышало средний популяционный уровень у животных опытных групп.

Таблица 1 – Цитогенетические показатели костного мозга белых мышей ($n=3$) под действием инактивированных вакцин против лейкоза ВРХ «Профилейк 3» и «Профилейк 4»

Препарат	Показатели	День эксперимента				
		до введения п-та	7 (до 2-го введения п-та)	14	30	60
Профилейк 3	МЯ ‰	2,8±0,6	5,0±0,57	1,6±0,3	2,6±0,3	1,0±0,0
	ДЯ ‰	19,3±0,3	12,3±0,8	12,6±0,8	17,6±3,1	18,0±1,5
	АП ‰	1,3±0,3	0,6±0,33	0,5±0,2	0,3±0,3	0
	МИ ‰	40,0±5,5	57,3±2,9	39,0±3,0	33,6±0,8	32,3±0,8
	Метафазы с ХА %	0,13±0,03	6,14±0,61	2,17±0,16	0,42±0,72	0,59±0,06
Профилейк 4	МЯ ‰	2,4±0,6	8,0±0,57	2,6±0,6	4,6±0,8	1,3±0,3
	ДЯ ‰	21,3±0,3	46,3±2,4	52,3±2,3	49,6±4,1	45,3±1,4
	АП ‰	1,4±0,3	0	0,6±0,1	1,6±0,3	0,6±0,3
	МИ ‰	43,0±5,5	65,0±1,5	41,0±0,5	41,0±3,2	37,3±0,8
	Метафазы с ХА %	0,15±0,03	5,23±0,82	2,90±0,17	0,68±0,19	0,10±0,21
Контроль	МЯ ‰	2,6±0,6	2,8±0,2	2,8±0,4	2,4±0,8	2,6±0,4
	ДЯ ‰	20,6±0,4	21,3±0,3	22,4±2,6	22,8±1,2	21,8±3,6
	АП ‰	1,2±0,8	1,3±0,3	1,8±0,5	1,6±0,2	1,4±0,3
	МИ ‰	40,0±5,5	41,0±3,6	40,0±0,5	40,6±0,8	41,0±3,2
	Метафазы с ХА %	0,13±0,08	0,14±0,03	0,16±0,03	0,14±0,06	0,14±0,08

Через 7 дней после второго введения вакцины «Профилейк 3» и до конца экспериментального периода (60 дней) проходило восстановление в направлении начального уровня числа ДЯ клеток, клеток с МЯ, ХА и МИ. Следовательно, повторное введение иммуногена не вызывает столь существенных изменений в функциональном состоянии костного мозга мышей. Похожая картина наблюдалась и при применении препарата «Профилейк 4», за исключением ДЯ клеток. Их количество на 30-ый день опыта увеличилось в 2,3 раза по сравнению с изначальным уровнем, а на 60-ый день - уровень снизился в 0,9 раза относительно предыдущего исследования.

Если в костном мозге мышей первой опытной группы АП динамически уменьшались до полного отсутствия при последнем исследовании, то у животных второй группы исчезновения изучаемого состояния клеток проявлялось только на 7 день опыта. После второго введения препарата состояние апоптоза у животных второй группы доходило до показателей контрольных мышей.

Авторами публикаций [0,0,0] доказано, что регуляция иммунных процессов тесно связана с феноменом апоптоза иммунокомпетентных клеток. Исходя из этого, снижение апоптоза в клетках костного мозга опытных мышей может быть обусловлено их активным дифференцированием, что связано с формированием антигенспецифической составной иммунной системы, в значительной степени реализации её эффекторных функции и дегенеративных процессов в иммунокомпетентном органе [0,0]. Полученные данные характеризуют процессы формирования клеточного гомеостаза на уровне организма [0] и усиление межклеточных контактов, которые могут не допускать развитие апоптоза [0].

Учитывая выявленные закономерности цитогенетических характеристик клеток, изменения показателя мутагенности следует расценивать не как показатель токсичного действия препарата, а как признак, по данным Ярилина А.А., [0], его иммуногенности. Автор отмечает, что вакцинный мутагенез способствует дифференцированию В-лимфоцитов в клетки, которые секретируют Ig G и появлению клонов с более высоким родством к антигену, чем в В-клетках предшественниках. При высоком родстве рецепторов В-лимфоцитов к антигену, у них экспрессируется фактор «выживания» клеток Bcl-2. Именно этим можно объяснить обнаруженное нами снижения апоптоза в иммунокомпетентных клетках костного мозга подопытных мышей после введения иммуногена (табл.).

Согласно данным литературы, существует прямая зависимость между числом хромосомных aberrаций и активностью митотического процесса, который способствует появлению клеток с МЯ [0], а также образования избытка ДНК [0]. Таким образом, выявленное увеличение микроядер свидетельствует о количественных изменениях ДНК в живой клетке.

Отличие в изучаемых показателях животных двух опытных групп может быть обусловлено разницей в методическом подходе конструирования вакцинных препаратов, которое предопределило не одинаковое влияние на гуморальное и клеточное звено иммунной системы. Это еще раз свидетельствует о том, что изменения мутагенного направления в клетках костного мозга мышей в период опыта происходили, как правило, в результате первичного иммунного ответа.

Заключение. Полученные данные удостоверяют во-первых, высокую функциональную реакцию костного мозга в первые 7 дней после первой инокуляции исследуемых иммуногенов; во-вторых, каждый антигенный препарат имеет свои специфические действия, которые обусловлены структурными отличиями биологического носителя антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота; в-третьих, высокую чувствительность изучаемого метода оценки действия вакцин против ретровирусов на систему иммуногенеза в начальной стадии формирования иммунокомпетентных клеток; в-четвертых, вакцины вызывают в лимфоидных клетках костного мозга временные признаки мутагенеза.

Литература. 1. Ильин Д.Я. Аспекты формирования микроядер / Д.Я. Ильин // *Естествознание и гуманизм*. – 2006, Т.3, Вып.3. – С. 58. 2. Ильинских И.Н. Инфекционная кардиопатология / И.Н. Ильинских, В.В. Новицкий, Е.Н. Ильинских, Н.Н. Ильинских, С.Б. Ткаченко. – Томск: Изд-во Том ун-та, 2005. – 168 с. 3. Ильинских И.Н. Цитогенетический анализ последствий инфекционного мутагенеза в связи с состоянием иммунореактивности организма: автореф. дис. ... на соиск. учен. звания докт. биол. наук: спец. 03.00.15. «Генетика» / И.Н. Ильинских. – Томск, 1984. 42 с. 4. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока / Ф.И. Ингель // *Экологическая генетика*. – 2006. – Т.4., №3. – С. 7-19. 5. Методические рекомендации по цитогенетическому тестированию в свиноводстве [Яковлев А.Ф., Стефанова В.Н., Россоха В.И., Ефименко Л.И.]. – Харьков: УкрНИИ метал лов, 1990. – 24 с. 6. Серенот Ч.К. Изучение изменений морфологии ядра культуры клеток К 562 под воздействием вакцин вирусов / Ч.К. Серенот // *Сб. науч. работ по материалам 64-й Междунар. научн. студе. конф. им. Н.И. Пирогова* – Томск., 2005. – С. 52. 7. Сивакова Т.Н. Кариопатическое действие вакцины Нобивак Rabies на клетки костного мозга и семенников белых мышей / Т.Н. Сивакова, Е.А. Мыльникова // *Фундаментальные медико-биологические науки и практическое здравоохранение*. – Пермь: 2010 – С. 46-49. 8. Федорова Н.Е. Блок клеточной пролиферации и патологии митоза в клетках, инфицированных цитомегаловирусом / Н.Е. Федорова, А.А. Меджидова, М. Г. Меджидова, А. А. Куц // *Доклады академии наук* - 2003. – Т. 392/4. – С. 552-555. 9. Черкезия С.Е. Исследование хромосом в клетках костного мозга мышей, иммунизированных антирабическими вакцинами / С.Е. Черкезия, Г.Р. Михайлова, Л.П. Горшунцова // *Цитология и генетика*. – 1980. – Т.14, №4. – С. 67-70. 10. Ярилин А.А. Апоптоз и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // *Глаукома*. – 2003, № 2. – С.46-54. 11. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А.А. Ярилин // *Иммунология*. – 1996. – Т. 6. – С. 10-23. 12. Brodbeck W.G. Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced and spontaneous apoptosis of biomaterial adherent macrophages / W.G. Brodbeck, M.S. Shive, E. Colton, N.P. Ziats, J.M. Anderson // *J. Lab. Clin. Med.* - 2002. - V. 139. - № 2. - P. 90 – 100. 13. Saito T. Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer / T. Saito, I. Kuss, G. Dworacki, W. Gooding, J. T. Johnson, T. L. Whiteside // *Clin. Cancer Res.* - 1999. - № 5. - P. 1263-1273. 14. Shimizu N., Kamezaki F., Shigematsu Sh. Tracing of microinjected DND in live cells reveals the intracellular behavior and elimination of extrachromosomal genetic material // *Nucleic Acid Research*. - 2005. - Vol. 33, N 19. - P. 6296–6307.

УДК 636.5:611.4:619:616.98.578

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОСТНОМ МОЗГЕ ЦЫПЛЯТ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ**Громов И.Н., Прудников В.С., Селиханова М.К.**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь**Алиев А.С., Бурлаков М.В.**ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»
г. Санкт-Петербург, Россия

Экспериментальное заражение СГФ-цыплят вирусом инфекционной анемии цыплят вызывает угнетение эритроцитарного и гранулоцитарного кроветворения в костном мозге, снижение парциальных формул костномозговых клеток, а в крови - нарушение структуры эритроцитов и тромбоцитов, уменьшается число эозинофилов и псевдоэозинофилов. Регенерационные процессы характеризуются активизацией лимфоидного кроветворения в костном мозге, а также появлением зернистых лимфоцитов, малодифференцированных форм эритроцитов в крови.

It is established, that at an experimental infectious anaemia in an osteal brain of chickens there is an oppression erythrocyte and granulocyte hemopoiesis, depression of partial formulas of medullar cells, and in blood - disturbance of frame of erythrocytes and thrombocytes, the number of eosinocytes and pseudoeosinocytes decreases. Reclaiming processes are characterised by activation of a lymphoid hemopoiesis in an osteal brain, and also appearance of acinose lymphocytes, blast forms of erythrocytes in blood.

Введение. Инфекционная анемия – высококонтагиозная вирусная болезнь цыплят раннего возраста, характеризующаяся поражением кроветворной и иммунной систем, серозными отеками подкожной клетчатки и некрозами кожи [1, 4]. Возбудителем болезни является ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Circoviridae*, роду *Gyrovirus* [3]. Вирус репродуцируется в кроветворных клетках красного костного мозга вызывая массовую гибель клеток всех ростков гемоцитопоэза с последующим замещением красного костного мозга на желтый костный мозг. Дефицит предшественников Т- и В-лимфоцитов обуславливает развитие атрофии лимфоидной ткани в тимусе, бурсе Фабрициуса, периферических органах иммунитета. поражение эритропоэзного кроветворения приводит к развитию общей анемии. На фоне приобретенного иммунодефицита активизируется условно-патогенная микрофлора, появляются некрозы в коже. Инфекционная анемия часто протекает в ассоциации с болезнями Марека и Гамборо [1, 10].

Болезнь впервые зарегистрирована в Японии в 1979 году [1]. В настоящее время вспышки инфекционной анемии регистрируются во многих странах с развитым птицеводством. Результаты исследований В.А. Лобанова и др. [9] свидетельствуют о широком распространении вируса инфекционной анемии цыплят в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации, Украины и Республики Беларусь. В крупных птицеводческих хозяйствах промышленного типа инфекционная наносит значительный экономический ущерб, который обусловлен гибелью птицы, низкими приростами и оплатой корма, снижением категорийности тушек, повышенной выбраковкой, расходами на лечение вторичных инфекций и проведение соответствующих ветеринарно-санитарных мероприятий [4].

В отечественной и зарубежной литературе имеется недостаточно сведений, посвященных изучению патоморфологических изменений в органах и тканях цыплят при инфекционной анемии. Вместе с тем, гистологическое исследование патологического материала позволяет в кратчайший срок поставить предварительный диагноз, что очень важно для организации и проведения предварительных противоэпизоотических мероприятий, и наметить направление дальнейших лабораторных исследований.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение структурных изменений в костном мозге и крови птиц при экспериментальном заражении вирусом инфекционной анемии.