

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 карнопатология / 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. Карнопатическое 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. Горшунова // *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 *Cyrovirus* [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.

Материал и методы. Исследования были проведены на СПФ-цыплятах суточного возраста. Птицы была подобрана по принципу аналогов и разделена на 2 группы, по 15 цыплят в каждой. Цыплят 1 группы в суточном возрасте внутримышечно заражали вирулентным штаммом вируса инфекционной анемии. Вирусосодержащим материалом служил стерильный 20%-ный гомогенат печени спонтанно больных цыплят-бройлеров, обработанный по общепринятой методике. Интактные цыплята 2 группы служили контролем. За всей птицей было установлено клиническое наблюдение. На 21 день после заражения цыплят убивали для проведения морфологических исследований.

При проведении морфологических исследований кровь получали из яремной и крыловой вен [5]. Мазки крови птиц готовили на тонких обезжиренных предметных стеклах, высушивали на воздухе, фиксировали в метаноле и окрашивали по Романовскому–Гимза [5]. Лейкограмму выводили на основании подсчета 100 клеток. Дифференциацию Т- и В-лимфоцитов проводили с учетом размера клеток, величины ядра, цитоплазмы, интенсивности их окраски.

Для проведения морфологических исследований костного мозга отбирали кусочки кости, фиксировали в 10% растворе формалина, проводили их декальцинацию 1 н раствором уксусной кислоты по Лилли [7] в нашей модификации. Зафиксированный материал подвергали уплотнению путем заливки в парафин по общепринятой методике, а также замораживанием [8]. Обезвоживание и парафинирование материала проводили с помощью автомата для гистологической обработки тканей «MICROM STP 120» (Германия) типа «Карусель». Для заливки кусочков и подготовки парафиновых блоков использовали автоматическую станцию «MICROM EC 350». Гистологические срезы кусочков органов, залитых в парафин, готовили на роторном (маятниковом) микротоме «MICROM HM 340 E».

Для изучения общих структурных изменений срезы окрашивали по Паппенгейму [5]. Депарафинирование и окрашивание гистосрезов проводили с использованием автоматической станции «MICROM HMS 70».

Миелограмму выводили, исходя из подсчета 1000 клеток в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимза [5]. При подсчете костномозговых клеток поддерживались унитарной теории кроветворения, дополненной И.А. Болотниковым и Ю.В. Соловьевым [2].

Наряду с оценкой миелограммы выводили парциальные формулы различных групп клеток костного мозга [5, 6]: лейкоэритробластический индекс – соотношение костномозговых элементов лейкоцитарного и эритроцитарного ростков; костномозговой индекс созревания псевдозозинофилов – отношение молодых клеток псевдозозинофильной группы (промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты) к зрелым псевдозозинофилам (палочкоядерные, сегментоядерные); костномозговой индекс созревания эозинофилов – соотношение молодых (промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты) и зрелых (палочкоядерные, сегментоядерные) клеток эозинофильной группы; костномозговой индекс созревания эритронормобластов – отношение числа гемоглобинизированных форм нормоцитов (полихроматофильные нормоциты) к количеству всех клеток эритроидного ряда.

Цифровые данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel 2003.

Результаты исследований и их обсуждение. При гистологическом исследовании костного мозга интактных 21-дневных цыплят установлено, что строма органа была образована соединительнотканной трабекулами, отходящими от эндооста кости. В метафизарной области выявлялись также участки хрящевой ткани (рисунок 1). В эндотелиальной выстилке капилляров, а также среди элементов ретикулярной ткани локализовались макрофаги, содержащие гранулы железосодержащих пигментов. В петлях ретикулярной сети располагались молодые и зрелые гемопоэтические элементы. Развивающиеся диффероны кроветворных клеток располагались островками. При этом эритробластические островки часто формировались в непосредственной близости от макрофагов (рисунок 2). Созревающие гранулоциты также лежали в виде островков. Клетки тромбоцитарного ряда (тромбопласты, протромбоциты и тромбоциты) локализовались, как правило, рядом с синусоидными капиллярами. Вокруг кровеносных сосудов встречались также небольшие группы лимфоцитов и моноцитов. Среди клеток костного мозга преобладали малодифференцированные клетки. Желтый костный мозг выявлялся в диафизах трубчатой кости. Он состоял из ретикулярной ткани, которая местами была замещена скоплениями липоцитов.

В костном мозге птиц опытной группы выявлялись признаки атрофии миелоидной (кроветворной ткани). Так, кроветворные были представлены лишь небольшими группами или диффузными скоплениями, которые локализовались вокруг синусоидных капилляров и артериол (рисунки 3; 4). Характерные полноценные кроветворные островки выявлялись крайне редко. При этом основные структурные изменения со стороны гемопоэтических элементов регистрировались чаще в центральной части органа и значительно реже – в пространствах под периостом (рисунок 5). Учитывая характер морфологических изменений в костном мозге цыплят в отдаленные сроки исследований (на 21 день после заражения) можно предположить, что они были обусловлены длительной репликацией вируса в клетках-мишенях (предшественниках эритроцитов и гранулоцитов).

Наряду с процессами аплазии эритроидного и гранулоцитарного кроветворения в костном мозге большинства подопытных птиц отмечена выраженная гиперплазия клеток лимфоидного ряда. При этом крупноочаговые скопления лимфоцитов различной степени зрелости визуализировались в периферической части органа непосредственно под периостом (рисунок 6). Указанные изменения носили, скорее всего, компенсаторно-приспособительный характер.

В миелограмме цыплят опытной группы мы отмечали достоверное уменьшение в 1,3 раза общего количества гранулоцитов по сравнению с контролем. Изменение данного показателя происходило в основном за счет клеток псевдозозинофильного ряда.

Общее количество эритробластических клеток в миелограмме подопытных птиц уменьшалось с $47,00 \pm 1,18$ % (контроль) до $33,15 \pm 1,24$ % ($P < 0,001$), а число лимфоцитов наоборот, увеличивалось в 2 раза ($P < 0,01$). Различия в показателях по тромбоцитарному и моноцитарному рядам клеток между 1 и 2 группами

птицы были недостоверными. В костном мозге птиц опытной группы отмечено также снижение лейкоэритробластического индекса в 1,8 раза ($P < 0,01$), а также индексов созревания эозинофилов в 1,4 раза ($P < 0,05$) и псевдоэозинофилов в 1,3 раза ($P > 0,05$) по сравнению с контрольными значениями. Указанные изменения являются показателем аплазии клеток гранулоцитарного роста под воздействием цирковируса.

В мазках крови интактных цыплят на 21 день эксперимента выявлялись форменные элементы эритроцитарного, тромбоцитарного, моноцитарного, миелоидного и лимфоидного ростков.

Структурные компоненты клеток имели четкие контуры, хорошо прокрашивались. Патологических форм клеток в мазках крови цыплят контрольной группы в этот срок исследований не обнаруживалось. В лейкограмме интактных птиц преобладающими формами являлись Т-лимфоциты ($27,25 \pm 3,09$ %), В-лимфоциты ($17,00 \pm 3,09$ %) и сегментоядерные псевдоэозинофилы ($27,50 \pm 5,06$ %). В достаточном количестве выявлялись также базофилы, эозинофилы и моноциты. Наличие в лейкограмме относительно большого числа юных ($4,25 \pm 0,84$ %) и палочкоядерных псевдоэозинофилов ($9,25 \pm 1,40$ %) связано, очевидно, с возрастными особенностями кроветворения цыплят на данном этапе исследования.

При исследовании мазков крови подопытных цыплят выявлены существенные структурные изменения всех форменных элементов, но особенно – клеток эритроидного и тромбоцитарного ростков. Так, заражение цыплят цирковирусом приводило к появлению патологических форм эритроцитов, имеющих малые размеры, конденсированный хроматин ядра и перинуклеарные зоны просветления в цитоплазме. Отдельные клетки принимали неправильную форму (округлую или наоборот, удлинненную с заостренными концами). Часто выявлялись эритроциты на разных этапах апоптоза (рисунку 7). В отдельных мазках визуализировались эритроциты, имеющие оксифильные перинуклеарные цитоплазматические включения. Компенсаторно-репаративные процессы со стороны эритроидного ростка характеризовались появлением в мазках большого числа незрелых форм клеток – эритробластов, базофильных, полихроматофильных и оксифильных нормоцитов (рисунки 8; 9).

Изменения со стороны клеток тромбоцитарного ряда характеризовались появлением крупных экземпляров округлой формы, имеющих выраженную вакуолизацию цитоплазмы и мелкие оксифильные гранулы вокруг ядра (рисунку 10). Инокуляция цыплятам цирковируса приводила также к появлению в крови больших зернистых лимфоцитов, имеющих морфологические признаки естественных киллерных клеток. Кроме того, в мазках крови цыплят опытной группы часто выявлялись плазматические клетки различной степени зрелости (рисунку 11). Лейкограмма подопытных птиц характеризовалась достоверным уменьшением, по сравнению с контролем, числа эозинофилов, а также различных форм клеток псевдоэозинофильного ряда. Кроме того, в мазках крови цыплят подопытной группы часто выявлялись гранулоциты в состоянии апоптоза. Указанные изменения сопровождалось увеличением в лейкограмме В-лимфоцитов в 2,5 раза ($P < 0,05$), а также моноцитов в 5 раз ($P < 0,01$; рисунку 12). При этом содержание базофилов и Т-лимфоцитов изменялось недостоверно.

Следует отметить, что изменения в лейкограмме подопытных цыплят коррелировали с морфологической перестройкой костного мозга.

Заключение. Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что при экспериментальном заражении цыплят цирковирусом в костном мозге птиц развивается аплазия миелоидной ткани, что подтверждается атрофией кроветворных островков, достоверным уменьшением количества клеток эритроцитарного и гранулоцитарного рядов, снижением лейкоэритробластического индекса, а также индексов созревания эозинофилов и псевдоэозинофилов. Основные морфологические изменения в крови подопытных птиц отмечаются со стороны эритроцитов (уменьшение размера клеток с конденсацией хроматина и просветлением цитоплазмы, появление уродливых форм, развитие апоптоза) и тромбоцитов (увеличение размеров клеток, вакуолизация цитоплазмы с появлением в ней оксифильных гранул). В лейкограмме цыплят под воздействием цирковируса происходит достоверное уменьшение количества эозинофилов в 2,6 раза и псевдоэозинофилов в 3,5–4,4 раза при одновременном увеличении числа В-лимфоцитов в 2,5 раза и моноцитов в 5 раз. Компенсаторно-приспособительные и регенерационные процессы при экспериментальной цирковиральной инфекции характеризуются активизацией лимфоидного кроветворения в костном мозге, появлением бластных и незрелых форм эритроцитов, зернистых лимфоцитов, а также плазматических клеток в крови.

Литература. 1. *Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц* / Б.У. Кэлнек [и др.] ; под ред. Б.У. Кэлнека, Х. Джона Барнса, Чарльза У. Биерда и др.; пер. с англ. И. Григорьева, С. Дорощ, Н. Хрущева, И. Суворцев. – М.: АКВАРИУМ БУК, 2003. – С. 829–849. 2. *Болотников, И.А. Гематология птиц* / И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев. – Ленинград : Наука, 1980. – 115 с. 3. *Гусева, Е.В. Инфекционная анемия цыплят : Обзор литературы* / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина, Т.А. Фомина // ВНИИЗЖ. – Владимир, 1997. – 72 с. 4. *Инфекционная анемия цыплят* / А.С. Алиев [и др.] // *Ветеринарная медицина*. – 2011. – №1. – С. 49–53. 5. *Карпуть, И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных* / И.М. Карпуть. – Минск : Ураджай, 1986. – 183 с. 6. *Коленкин, С.М. Основные правила исследования пунктата костного мозга* / С.М. Коленкин, А.И. Михеева // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1999. – №2. – С. 41–43. 7. *Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия* / Р. Лилли ; под ред. В.В. Португалова ; пер. с англ. И.Б. Краснов [и др.]. – М.: Мир, 1969. – 645 с. 8. *Микроскопическая техника: Руководство* / Д.С. Саркисов [и др.] ; под ред. Д.С. Саркисова, Ю.П. Петрова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с. 9. *Серологический мониторинг инфекционной анемии цыплят и молекулярно-биологическая характеристика изолятов вируса* / В.А. Лобанов [и др.] // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. – 2003. – №2. – С. 66–69. 10. *Турицына, Е.Г. Критерии морфологической оценки иммунодефицитов птиц* / Е.Г. Турицына // *Сиб. вестн. с.-х. науки*. – 2009. – № 5. – С. 73–77.