

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
МИЧУРИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Артемьев Дмитрий Алексеевич

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ЛИМФОЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ
СПЕЦИФИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ НАРУШЕНИЯХ
КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА**

06.02.01 - Диагностика болезней и терапия животных, патология,
онкология и морфология животных

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
доцент А.В. Красников

Мичуринск - 2020

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Структурно-функциональные аспекты иммунной системы крупного рогатого скота	12
1.2. Возможности атомно-силовой микроскопии при исследовании морфометрических характеристик биообразцов	18
1.3. Применение цитохимических методов для изучения функциональных параметров лимфоцитов	24
1.4. Методы фракционирования крови	28
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Материал и методы исследования	33
2.2. Результаты исследований и их обсуждение	42
2.2.1. Гематологический статус исследуемых животных, как индикатор адаптивного иммунитета	42
2.2.2. Сравнительный анализ результатов АСМ-сканирования агранулоцитов крови интактного и инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота	52
2.2.3. Компаративная оценка функциональных показателей лимфоцитов при <i>BLV</i> и <i>BIV</i> -инфекции с применением фотометрических методов	61
2.2.4. Разработка способа получения лимфоцитов крупного рогатого скота	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	77
ВЫВОДЫ	82
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	83
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	84

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	86
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	106
ПРИЛОЖЕНИЯ	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Контроль формирования и координация функционирования адаптивного иммунитета в настоящее время являются актуальной и дискуссионной темой научной полемики в ветеринарной и в гуманной медицине. Как причиной, так и следствием нарушения различных звеньев иммунной системы являются гематопатологические состояния. При этом, белые клетки крови представляют собой ключевое звено эффекторно - аффлекторных механизмов в кинетике иммунного ответа [85, 126].

Современными высокоинформативными методами определения морфофункциональных особенностей биологических объектов, в том числе форменных элементов крови, являются ультрамикроскопические и фотометрические методы исследования, такие как атомно-силовая микроскопия (АСМ), колориметрический тест оценки метаболической активности клеток (МТТ), микроспектральный анализ. Данные методы при комплексном применении позволяют визуализировать 3D проекции образцов и определять биофизические (эластичность, адгезивность, ригидность), топографические (шероховатость), метаболические (активность НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктаз, кислотно-щелочной баланс) параметры, что является важным для развития современных подходов к диагностике и дифференциальной диагностике гематопатологических процессов [17, 54, 55, 63, 145, 151, 160].

Причиной возникновения гематопатологических состояний, приводящих, в том числе к нарушению клеточного звена адаптивного иммунитета, могут являться вирусные заболевания. В частности, ретровирусные инфекции крупного рогатого скота, вирусный иммунодефицит (*BIV*) и лейкоз (*BLV*), которые широко распространены и наносят значительный экономический ущерб животноводству [24, 29]. Учитывая биологические особенности возбудителей ретровирусных инфекций, до сих пор не существует средств специфической терапии и

профилактики вызываемых ими заболеваний, кроме возможности прерывания эпизоотического процесса через выбраковку животных [102, 110]. Вирусы иммунодефицита и лейкоза паразитируют в иммунокомпетентных клетках, лимфоцитах, изменяя их свойства. Передача возбудителей инфекции от больных животных к восприимчивым происходит чаще всего именно с инфицированным лимфоцитом [91]. В этой связи необходимо разрабатывать новые подходы в рамках противоэпизоотических мероприятий на основе сравнительного анализа морфофункциональных особенностей лимфоцитов интактного и инфицированного ретровирусами скота. Кроме того, многопараметрический анализ морфофункционального статуса форменных элементов крови при гематопатологических состояниях крупного рогатого скота необходим для разработки и внедрения новых способов ранней иммунокоррекции, что позволит сохранить генетический потенциал племенных и высокопродуктивных животных, тем самым избежав прямого и косвенного экономических ущербов.

Работа выполнена в рамках приоритетного направления «Устойчивое развитие сельских территорий» в соответствии с Программой стратегического развития федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Мичуринский государственный аграрный университет» на 2014–2020 гг.

Степень разработанности темы. Патогенез гиперпластических заболеваний кроветворной ткани крупного рогатого скота изучен недостаточно, он рассматривается как бластоматозный процесс с изменением морфофизиологических особенностей, характеризующийся гиперплазией ткани кроветворных органов: избыточностью, агрессивностью роста, атипичностью и «необузданностью» пролиферации, отсутствием цикличности в развитии затронутой процессом ткани [24, 36, 31, 71].

Согласно последним исследованиям, ригидность агранулоцитов (лимфоцитов) крови претерпевает значительные изменения в процессе гиперпластических заболеваний [24, 36]. По степени выраженности

изменений биофизических и морфологических характеристик лимфоцитов в целом можно судить о дегенеративных процессах в них. Для циркулирующих в кровяном русле лимфоцитов среди известных механизмов развития дегенеративных процессов наиболее значимыми считаются свободно-радикальные повреждения мембран, нарушения ферментативных систем, в частности гликолиза с переходом на анаэробный путь дыхания, и уменьшение репаративных процессов цитоскелета с изменением ионного состава клеток [24, 36, 79].

Значительная часть исследований, как отечественных, так и зарубежных ученых, посвящена проблемам диагностики ретровирусных заболеваний крупного рогатого скота, клинико - иммунологическим исследованиям больных животных, разработке подходов к оздоровлению стад и вопросам безопасности полученной от инфицированных животных продукции [47, 56, 77, 85, 134].

Отдельные, в основном зарубежные, исследователи занимаются вопросами изучения механизма взаимодействия ретровирусов с различными структурами клетки - носителя [106, 150]. Исследования, посвященные изучению структурно-функциональных показателей лимфоцитов, как клеточного звена адаптивного иммунитета, при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота в современной научной литературе представлены весьма ограниченно.

Цель и задачи исследования. Цель исследования - изучить структурно-функциональные особенности лимфоцитов крупного рогатого скота при *BLV*, *BIV* и *BLV/BIV*- инфекции в сравнении с таковыми у интактных животных.

В связи с поставленной целью, был определен ряд задач:

1. Выполнить сравнительный анализ гематологических показателей крупного рогатого скота при *BLV*, *BIV*, *BLV/BIV*- инфекции и интактного.

2. Проанализировать морфо-биофизические характеристики агранулоцитов крови интактного крупного рогатого скота и при *BLV*, *BIV*, *BLV/BIV*- инфекции методом атомно-силовой микроскопии.

3. Осуществить компаративную оценку метаболической активности лимфоцитов крови инфицированного ретровирусами и интактного крупного рогатого скота с помощью МТТ - теста.

4. Определить физиологический статус инфицированных ретровирусами и не инфицированных агранулоцитов крови крупного рогатого скота спектрофотометрическим методом.

Научная новизна. Научная новизна выполненных исследований заключается в том, что впервые осуществлен комплексный многопараметрический анализ морфологических, биофизических, метаболических свойств и физиологического статуса агранулоцитов крови инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота в сравнении с показателями лимфоцитов крови интактных животных. В результате исследований, проведенных с помощью атомно-силовой микроскопии, впервые выявлены изменения морфологических характеристик лимфоцитов, таких как диаметр, высота и объем, установлено, что адгезивные свойства, шероховатость поверхности и эластичность цитолемы лимфоцитов инфицированного крупного рогатого скота изменяются по сравнению с клетками интактных животных. С помощью МТТ-теста впервые обнаружены значительные изменения метаболической (дыхательной) активности лимфоцитов инфицированных ретровирусами животных. Впервые методом микроспектрального анализа выявлены выраженные различия в соотношении базофильных и оксифильных компонентов агранулоцитов при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота. Полученные данные коррелируют с результатами гематологических исследований, идентифицирующих нарушения гомеостаза инфицированных ретровирусами животных, очевидно, связанные с дефектом клеточного звена адаптивного иммунитета.

По результатам исследований подана заявка на патент РФ на изобретение (№ 2019110652 от 10.04.2019) «Способ получения лимфоцитов крупного рогатого скота».

Теоретическая и практическая ценность работы. Полученные нами результаты дополняют и расширяют фундаментальные данные в области изучения адаптивной пластичности и закономерностей структурной организации иммунной и гемопоэтической систем крупного рогатого скота. Данные, которые конкретизируют отдельные морфологические и функциональные отклонения агранулоцитов инфицированных ретровирусами животных, а также комплексная их оценка, имеют общебиологическое значение для сравнительной гематологии, патологии и морфологии в понимании аспектов морфогенеза и функционирования отдельных форменных элементов крови, что позволяет формировать новые задачи и направления в исследовании гемопоэтической и иммунной систем при ретровирусных заболеваниях животных.

Полученные в исследованиях значения могут быть использованы в качестве референсных параметров оценки морфологических и биофизических данных лимфоцитов крупного рогатого скота, их метаболической активности и физиологического статуса при изучении и дифференциации иммунопатологических состояний, прогнозировании течения ретровирусных заболеваний. Выявленные закономерности морфологических и функциональных показателей лимфоцитов крупного рогатого скота могут быть применены в качестве констант для раскрытия патогенеза гематопатологических состояний, а также при оценке степени повреждения иммунной и кроветворной систем при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота, о чем свидетельствуют акты внедрения результатов исследования в производство.

Методология и методы исследования. Методологической основой выполнения научной работы послужила необходимость в исследовании динамики структурно-функциональных изменений агранулоцитов

периферической крови крупного рогатого скота при заболеваниях ретровирусной этиологии, что необходимо для научного обоснования механизмов развития гематопатологических процессов и оценки возможности коррекции иммунопатологического состояния с целью поддержания гомеостаза организма животного. Для достижения поставленной цели и решения задач использовались гематологические, морфометрические, биофизические и колориметрические методы исследования с применением современного оборудования. Полученные материалы исследований статистически обработаны с применением общепринятых методик при применении приложения «Excel» входящий в программный пакет «Office XP» и «Statistica 8.0».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Структурная организация лимфоцитов крови крупного рогатого скота при ретровирусных заболеваниях отличается от таковой у интактных животных и коррелирует с наличием у них моно- или микст-инфекции.
2. Функциональное состояние лимфоцитов крови крупного рогатого скота обусловлено инфицированием животных *BLV*, *BIV* или присутствием *BLV/BIV* коинфекции.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена исследованием статистически значимого по объему экспериментального материала и подтверждена тем, что все данные гематологических, морфометрических, биофизических и колориметрических исследований получены с использованием стандартных методик на современном оборудовании с последующей математической обработкой.

Основные результаты научных исследований представлены, обсуждены и получили положительную оценку на конференциях различного уровня: Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (СПб, 2017); Международных конференциях профессорско-

преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2017 и 2018 года (Саратов, 2018, 2019); XXIV международной конференции «Развитие науки в XXI веке» (Харьков 2017); III - Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы в науке и практике» (Казань, 2017); International Symposium Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX (Саратов, 2017); I этапе Всероссийского конкурса научно-инновационных работ среди студентов, аспирантов и молодых ученых университета (Саратов, 2019); II этапе Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства по Приволжскому федеральному округу (Киров, 2019); III этапе Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства (Оренбург, 2019); International Conference on Applied Physics, Information Technologies and Engineering - APITECH-2019 (Красноярск, 2019); International Conference on Metrological Support of Innovative Technologies - ICMSIT-2020 (Красноярск, 2020), 72-й Международной научно-практической конференции студентов и аспирантов «Агровуз-2020: образование, наука, инновации» (Мичуринск, 2020).

Материалы исследований используются в учебном процессе и при выполнении научных исследованиях в ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ для преподавания специальных дисциплин студентам специальности «Ветеринария» и в научно-образовательном процессе по программе аспирантуры «Ветеринария и зоотехния».

Личный вклад соискателя. Постановка научной проблемы, формирование цели и задач, планирование, организация и проведение исследований осуществлены лично автором под руководством научного руководителя. В ходе проведения гематологических, морфометрических, биофизических и колориметрических исследований, статистической

обработки результатов, а также формирования выводов на основании полученных данных.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 14 научных работах, в которых отражены основные положения диссертации, в том числе 4 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ, 3 в изданиях, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science, и 1 заявка на патент РФ. Общий объем публикаций составляет 5,7 п.л., из них 2,1 п.л. принадлежат лично соискателю.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 116 страницах печатного текста и включает в себя введение, обзор литературных источников, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические предложения и перспективы разработки темы, а также список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы и приложения. Работа оформлена 20 рисунками и 5 таблицами, содержит 9 приложений. Список литературы представлен 165 источниками, из них 61 зарубежные.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональные аспекты иммунной системы крупного рогатого скота

Кровь является жидкой соединительной тканью, состоящая из форменных элементов и плазмы. Объем крови высших животных обуславливается видом, полом и интенсивностью метаболизма, он регулируется гомеостазом и достаточно постоянен. В организме крупного рогатого скота 45-60 литров крови или 7-10% от массы тела, в покое только 45-60% общего объема циркулирующей и 40-55% выключенной из кровообращения крови, являющейся депонированной [28, 32, 75].

Функции крови многообразны, одна из них транспортная – перенос питательных веществ, гормонов, биологически активных веществ, метаболитов и электролитов, тем самым осуществляя гуморальную регуляцию организма [22, 40, 42, 80, 100]. Терморегуляторная функция способствует поддержанию постоянства температуры тела, циркулируя с органами образующие и отдающие тепло. Выделительная функция сопровождается экскрецией конечных продуктов обмена веществ выделительными органами [100]. Дыхательная функция руководствуется транспортировкой дыхательных газов – кислород (O_2) и двуокись углерода (CO_2). А также, одной из самых главных, защитная функция, характеризующаяся деятельностью химических факторов, таких как антител, фагоцитарной активности лейкоцитов и иммунокомпетентными клетками, одним словом иммунного ответа [25, 26, 27].

Изучение механизма деятельности иммунного ответа (ИО), обладающего синергизмом клеточных и гуморальных компонентов иммунокомпетентной системы (ИКС), создает предпосылку для определенного фундаментального и прикладного интереса [1, 43, 94, 97]. Недостаток комплексного представления относительно механизмов иммунного статуса крупного рогатого скота (КРС) послужил основанием для

изучения формирования ИКС у этого вида животных в процессе филогенеза и постнатального онтогенеза [3, 22]. Ряд исследователей считают, что одним из фундаментальных направлений, в иммунологии, является изучение механизмов становления иммунной системы, их влияние на рост и развитие животных всех половозрастных групп, с возможностью корректировки патологий [3, 25, 36, 39]. Эффективность воспроизводства и реализация генетического потенциала пород зависят от состояния иммунной системы [79, 87, 93]. В этой связи актуальными направлениями ветеринарной медицины являются разработка и усовершенствование методов оценки иммунного статуса животных [45, 53, 93].

Ряд ученых считают, что не геном, а фенотип – объект действия иммунитета, так как иммунная система определяет структуру поверхности клеток, межклеточного и интерстициального матрикса. Данные операции исходят из способности различать собственные структуры организма от генетически гетерогенных компонентов, с дальнейшей реорганизацией и устранением последних, за счет врожденного и клеточного иммунитета [66, 88]. Врожденный иммунитет (ВИ) включает в себя два основных компонента: видовой иммунитет, обусловленный неспецифической устойчивостью против инфекции, особенностями температурного режима, отсутствием рецепторов адгезии для микроорганизмов; заимствованный иммунитет – в основном за счет IgG.

Признаками врожденного иммунитета являются: наследование при рождении, неспецифичность и устойчивость [44]. Функционирование ВИ основано на дифференцировке не конкретных патогенов, а молекулярных паттернов, образующихся при повреждении собственных клеток, ведущие к развитию фагоцитоза. Указанный процесс происходит в очаге воспаления с высвобождением большого количества медиаторов воспаления.

Вирулентность патогена направляет работу иммунной системы в новый режим. Ключевым событием является связь патогенного агента с макрофагами - структурной единицей врожденного иммунитета. На их

поверхности присутствуют рецепторы, идентифицирующие морфологические признаки патогенов, происходит активация и синтез противовоспалительных цитокинов (ИЛ 6, 8, 1 β , 1 α , фактор некроза опухолей α) [44]. Цитокины вовлекают в защитную реакцию эпителиально-эндотелиальные и дендритные клетки, обеспечивающие миграцию клеток в очаг воспаления. В очаг мигрируют моноциты с последующей дифференцировкой в макрофаги различных тканей, эти механизмы формируют моноклеарную стадию воспаления. На этой стадии происходит фагоцитоз патогенов. Важным механизмом ВИ являются естественные киллеры (NK-клетки). На их уровне реализуется идентификация своего и уничтожение клеток, заражённых вирусами или внутриклеточными бактериями, в том числе и злокачественных клеток [44].

Говоря о клеточном иммунитете, следует отметить, что клеточная организация иммунной системы делится на центральные и периферические органы [6, 7]. К центральным органам относят: красный костный мозг, тимус (вилочковая железа), пейеровы бляшки, а также миндалины, в которых происходит созревание лимфоцитов без существенного влияния антигенов. Основной их задачей является контроль над созреванием и функционированием Т- и В- лимфоцитов [66].

К периферическим органам иммунной системы относятся: ретикулоэндотелиальная система (РЭС), лимфатическая система, селезенка и кровь [26, 30, 41, 66]. Развитие данных органов напрямую зависит от антигенной работы. При контакте с антигеном, формируются процессы пролиферации и дифференцировки, обеспечивающие процессы иммунологических реакций [22, 25].

Лимфатическая система является центральным звеном иммунитета, в которой лимфоцит, на клеточном уровне, является структурной единицей [4, 22]. Плюрипотентные клетки характеризуются как родоначальники клеточной организации иммунной системы. Лимфоциты всех типов формируются стволовыми клетками красного костного мозга. Из них,

приоритетными популяциями являются Т- и В-клетки. Популяция Т-лимфоцитов формируются в тимусе (вилочковая железа), называемые тимусзависимыми. Однако, популяция В-лимфоциты, в эмбриогенезе, дифференцируются в гепатобилиарной системе, а в онтогенезе совершенствуются в красном костном мозге, тем самым характеризуются как тимуснезависимыми [25, 35, 36]. Из-за морфологических и функциональных отличий, лимфоидные клетки формируют популяции и субпопуляции.

Популяция Т-лимфоцитов разнообразна и представлена следующими видами: Т-киллеры, Т-супрессоры, Т-хелперы-индукторы, Т-амплифайеры, Т-дифференцирующие. Организация В-лимфоцитов состоит из: В-клеток – продуцентов антител, В-супрессоров, В-хелперов, В-киллеров [35, 36].

Все перечисленные клеточные структуры имеют определенное кооперативное взаимодействие. Т-система регулирует деятельность В-системы, обеспечивая иммунокомпетентность лимфоидной системы. Т-лимфоциты осуществляют деятельность клеточного иммунитета из-за специфических рецепторов и маркеров, формирующихся в процессе гистогенеза [41]. В-лимфоциты формируются в плазматические клетки, способные образовывать антитела, тем самым, обуславливая гуморальный иммунитет, обеспечивающие протекцию организма [66].

Иммунные функции организма, в своем большинстве, развиваются пренатально. Постнатально иммунная система динамична и постоянно совершенствуется в процессе онтогенеза. Новорожденный организм подвергается воздействию различных факторов, способствующих активизации процессов развития и модернизации иммунной системы [20, 88].

В сравнении с взрослыми животными новорожденный организм имеет сниженную резистентность, характеризующуюся пониженным уровнем антител и замедленной их продукцией. Известно, что в раннем возрасте организм способен образовывать антитела на относительно большие дозы антигена, так как малые дозы, не способны форсировать иммунологическую инертность организма. Первичные контакты макроорганизма с инфекцией,

именно тут определяется различие ответной иммунологической реакции, на многочисленную экспансию антигенами, новорожденного и созревшего организмов [3, 22].

В связи с этим, различают несколько факторов чувствительности и специфичности макроорганизма к инфекциям в первые дни жизни: А – малый уровень синтеза антител со слабой активностью Т-клеток; Б – сниженный метаболизм лимфоидных клеток, способствующий развитию чужеродных агентов с ростом инфекционных очагов; В – сниженная защитная функция РЭС.

В раннем постнатальном периоде дифференциация иммунокомпетентных клеток замедлена. В данный период образуются плазматические клетки, синтезирующие антитела. Ряд исследователей считают, в первые месяцы жизни развитие иммунного аппарата регулируется пролиферацией и дифференциацией плазматических клеток, характеризующейся гиперплазией тимуса, РЭС и селезенки [98]. Быстрее всех начинает функционировать вилочковая железа, закладывающаяся у крупного рогатого скота на 25 - 27 сутки эмбрионального периода в виде энтодермального покрова. Постепенно из эпителия формируются дольки, приобретая отросчатую структуру. Определяется сеть циркулярно расположенных эпителиоретикулярных клеток (ЭРК), по-другому названных тельцами Гассалья. Физиологически данный орган (тимус) созревает в период эмбриогенеза, достигая к 7 месяцам до 2% массы плода. При рождении его масса составляет 0,5%, а в половозрелом возрасте – до 0,1%, в результате замедления скорости роста тимуса. При этом, концентрация Т-лимфоцитов в данном органе достигает от 70 до 90% [25, 26, 41].

В процессе постнатального периода происходит физиологическая инволюция вилочковой железы с сокращением объема органа, с сохранением кортико-медуллярного сочленением. Обусловлено это чувствительностью кортикальных тимоцитов к кортикостероидным гормонам надпочечников.

Поступление в тимус предшественников Т-лимфоцитов, а также их созревание, сохраняются в течении всей жизни [88, 93].

Образование предлопаточных и средостенных лимфатических узлов подходит к концу второго месяца эмбриогенеза, а бронхиальных, брыжеечных и подчелюстных лимфоузлов к 3 - 4 месяцу. Уже к 5-и месячному возрасту плода они приобретают строение и форму схожие с таковыми у взрослого организма [26, 41].

К лимфоидному аппарату селезенки относятся лимфоидные муфты и узелки, располагающиеся в местах бифуркаций артерий, также макрофагально-лимфоидные муфты, находящиеся на концах артериальных и венозных синусов и сосудов [25]. Периартериальные муфты характеризуют собой структурированные вокруг артериол лимфоциты. В селезенке созревшего животного, физиологически, содержится 15 - 34% Т-лимфоцитов. У новорожденных телят довольно хорошо представлены клеточные факторы защиты, а гуморальные достигают своей совершенности к 9 месячному возрасту [4, 25, 26].

В индукции иммуногенеза и реализации иммунной реакции необходимо целостное взаимодействие клеточного и гуморального иммунитета. Жизнеспособность, а также выживаемость организма определена его иммунной системой, берущее начало с неонатального и постнатального времени развития индивидуума [78]. Также, определенным является то, что рецепторы и маркеры являются параметрами функциональной активности лимфоцитов, с их стадийной дифференцировкой. К сожалению, в литературе, по крупному рогатому скоту, такие данные носят единичный характер. Тем самым, одной из актуальнейших, на сегодняшний день, проблем является изучение функциональных характеристик, свойств и структуры клеток крови при различных системных нарушениях.

Итак, живой организм обитает в среде с большим количеством патогенных микроорганизмов (бактерии, грибы, вирусы и паразиты), в связи

с этим организм имеет защитную систему. «Первая линия» иммунной обороны – врожденный иммунитет – уничтожает внедрившиеся в макроорганизм патологические агенты, на основе взаимоотношения «свой - чужой», определяя характерные черты, присутствующие у чужеродных агентов, при этом отсутствующие в собственном организме. Однако, в случае сильной вирулентности инфекции включается в работу «вторая линия» – приобретенный (адаптивный) иммунитет. Он основан на работе В- и Т-лимфоцитов, действуя образованием специфических, к определенной инфекции, антител и «клеток - убийц», реорганизуя и элиминируя зараженные клетки. Приобретенный иммунитет, в отличие от врожденного, способен идентифицировать новые антигены и сохранять память о них, при этом сразу реагировать при следующей встрече с этим чужеродным агентом. Завершающую элиминацию оканчивает врожденный иммунитет.

1.2. Возможности атомно-силовой микроскопии при исследовании морфометрических характеристик биообразцов

Середина и конец прошлого столетия стало временем целенаправленного развития неоптической микроскопии, решение ограничений оценок функциональных свойств клеток с созданием оптической и электронной микроскопии, новыми целями и задачами, поставленными перед наукой [125].

Одним их первых шагов в этом направлении был сделан в сороковые годы прошлого столетия, связанный с изобретением Эрнстом Августом Фридрихом Руской - трансмиссионного электронного микроскопа [81]. Электронные микроскопы способны получать изображения с максимальным разрешением (до 0,1 нм), но у них присутствует ряд недостатков и затруднений. Имеется ввиду потребность нанесения металлического слоя на материалы плохо проводящие электрический ток и создание вакуума для проведения исследований при облучении пучками электронов высокой

энергии [138]. Данные условия только косвенно отражают функциональные свойства биологических образцов [92].

Следующей ступенькой создания неоптической микроскопии послужило изобретение в 1984 году сканирующего туннельного микроскопа нобелевскими лауреатами Карлом Биннингом и Генрихом Рорером [37]. Принцип работы, данного микроскопа, основан на эффекте прохождения тока между металлической иглой и исследуемом образцом во внешнем электрическом поле. Данный метод способен построить 3D изображение рельефа поверхности за счет анализа интенсивности туннельного тока. Из недостатков данного прибора, также является наличие вакуума с созданием электрической проводимости для исследования биоматериалов.

В 1986 году неоптические методы исследования вышли на новый уровень, данному развитию зондовой микроскопии послужило создание атомно-силовой микроскопа (АСМ) Карлом Биннингом, Кельвином Куэйтом и Кристофером Гербером [112].

АСМ включает в себя набор методик, использующих движущийся по поверхности или над ней зонд, регистрирующего, с помощью программного обеспечения, топографические параметры и свойства исследуемой поверхности. АСМ был создан, для получения снимков ультравысокого качества твердых и эластичных поверхностей, невзирая на их электрическую проводимость в воздушных и жидких средах. [126, 132].

Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силовой работы зонда атомно-силового микроскопа и поверхностью исследуемого образца. Зонд - это наноразмерное остриё, располагающееся на кантилевером. Сила, работающая на зонд, способствует к изгибу консоли. Производится регистрация величины изгиба кантилевера, из-за изменения силы, действующей на зонд, в следствии появления возвышенностей или впадин при исследовании образцов. Таким образом можно сделать вывод о рельефе поверхности образцов [132].

Атомно-силовой микроскоп фиксирует изменения мест положения кантилевера в Real-time с высокой скоростью, способный строить силовые кривые, для расчёта модуля Юнга (МЮ) исследуемого биоматериала, например, с помощью модели Герца. Данная модель рассматривает изучаемый материал в качестве однородной и ровной поверхности, по сравнению с площадью наконечника кантилевера [126, 133].

АСМ начали использовать для измерения физических свойств, в том числе биологических образцов микро и нано-масштаба [105, 148, 143, 130]. При работе с биоматериалами в воздушной среде главным составляющим работы зонда и образца является сила отталкивания, Вандерваальсовы силы, а также капиллярные силы, из-за присутствия пленки на поверхностях биологических образцов [159].

С помощью атомно-силовой микроскопии, возможно производить исследования в сфере клеточной морфологии и визуализации структуры поверхностных белков, так же оценивать свойства живых клеточных структур, как адгезия, электростатичность, ригидность, молекулярное связывание с мобильностью поверхностных слоев [64, 104, 152, 155, 157]. Данное научно-техническое направление является перспективным в зондовой (сканирующей) микроскопии и в данное время бурно разрабатываются технологические модули сканирования с моделями интерпретации данных полученных результатов [64].

Выделяют несколько режимов сканирования: резонансные (колебательные) и контактные. С помощью колебательного режима можно регистрировать взаимодействия зонда и образца с фиксацией резонансной частоты и изменений амплитуды колебаний. Режим фазового контраста основан на регистрации величины сдвига фаз колебаний кантилевера [76].

Выбор определенного режима регулируется жесткостью объектов, устойчивостью механического давления и среды, в которой будет производиться сканирование. Графики, изображение и сканы, полученные в контактном режиме работы, получают высокую разрешающую способность и

четкость [146]. Но данный метод имеет недостаток, заключающийся в ограниченности био-образцов для исследования, из-за вероятности травматизации клеточных мембран и биологических составляющих, в связи с этим необходим выбор специальных кантелеверов [153].

Щадящим характером сканирования с меньшей разрешающей способностью и малой шумоустойчивостью обладает резонансный режим [116]. Он является оптимальным для исследований, как в жидкой, так и в воздушной среде. Этим режимом можно визуализировать и производить интерпретацию крупных объектов (молекул), мембранные субъединицы, а также рельеф клеточных структур без деформаций и искажений поверхности объектов [123, 125, 133].

Так же режим работы следует учитывать при выборе подготовке материалов для сканирования, речь о методах фиксации, что является достаточно сложной задачей с учетом сохранения исходных биофизических данных образцов с созданием их однослойности [64, 90, 141].

Для микроскопии объектов подходит стеклянная подложка или дощечки на основе полистирола [76].

Наиболее подходящими объектами для АСМ - сканирования являются имеющие однотипную форму клеточные структуры, которые легко выделяются из организма, поэтому широко применяется для изучения биофизических и морфофункциональных свойств бактерий, вирусов, волос, эякулятов, клеточных субпопуляций и клеток крови [37, 83, 137, 153, 158]. Особое место в АСМ занимает сканирование клеток крови, вследствие особенностей строения данных клеток и простоты получения образцов [121, 155].

С момента изобретения АСМ в 1986 году, он динамично используется в биологии и медицине, это объяснимо рядом особенностей: высокое разрешение получаемых изображений, способность построения моделей объектов и измерения их свойств.

Разработка и усовершенствование режимов и методик, способные проводить сканирование в воздушных и жидких средах, увеличивает возможность сканировать биообъекты в их физиологической среде. Все это способствует внедрению АСМ для биологических и медицинских исследований.

С помощью АСМ изучается структура белковых молекул и их функции. Группа исследователей провела серьезную работу по изучению олигомеров белка сеипина (seipin) при синдроме Берардинелли-Сейпа у человека. Этот пример показывает способности АСМ по воспроизведению изображений биомолекул высокого качества (четкости) с измерением адгезивности [27, 70, 123].

Так же с помощью данного метода можно измерять взаимодействия крупных белковых молекул, это продемонстрировано на примере анализа механизмов димеризации амилоидов [161]. В связи с этим данный метод стал активно использоваться для исследования взаимодействий клеток на молекулярном уровне [118, 127].

Определенные работы показывают, что в дальнейшем АСМ может быть использована в исследованиях иммунной системы [5, 117].

Способности АСМ по изучению структуры всецело применяется при изучении ДНК, РНК, мультибелковых комплексов, хромосом, с комплексным рассмотрением строения и функций мембранных рецепторов и трансмембранные рецепторы живых клеток.

При исследовании ДНК главную роль играют методы приготовления препаратов с фиксацией молекул на подготовленной поверхности [116, 140, 139]. Способность визуализации работы комплексов ДНК с белковыми структурами и способность измерения структурно-топографических свойств позволяют лучше понять биохимические процессы мономолекулярного уровня и получить больше информации о регуляции генов [159].

С помощью данного микроскопа есть возможность определения физических параметров: гидрофобность поверхностей, взаимодействия

молекул, электрический заряд образцов с их механическими свойствами [131]. Создание АСМ стало толчком к подробному изучению вирусных частиц, их строения и адгезивных свойств [117, 120, 133, 144]. Группа ученых, с помощью АСМ, установили роль белков оболочки в структуре цитоскелета вируса, его инвазивной активности для дальнейшего внутриклеточного производства вирионов [6, 7, 64, 155, 158]. Атомно-силовая микроскопия применяется в исследованиях структуры и физико-биологических характеристик вируса *HIV* и инфицированных им агрунолоцитов [142]. Рядом научных школ, производились измерения модуля Юнга вирусных субпопуляций *HIV* и обнаружили связь биофизических свойств вируса и вирулентностью. Так был продемонстрирован новый аспект регуляции репликации [104, 158]. Другая группа ученых, руководствуясь данным методом, показала влияние некоторых веществ на адгезивные и цитотоксические характеристики вирусов *HIV* [157].

Атомно-силовая микроскопия находит все более широкое внедрение в решении биомедицинских задач. Так в работах российских исследователей демонстрируется регистрация биологических и химических веществ, как в газовых, так и в жидких средах, что открывает перспективы практического применения биомедицинского назначения [101].

Есть возможность измерения физических взаимодействий клеточных структур, такие как адгезивные, эластические и электростатические силы, а также упругость клеточной стенки с определением локализации специфических белков [11, 12, 13, 158].

Все это, говорит об АСМ, как о методе, создающим модели ультраструктуры клеток с возможностью измерения их биофизических и морфофункциональных свойств [113].

Лимфоциты являются одними из важнейших клеточных структур, доступных для выделения, в связи с созданием ими клеточного иммунитета, поэтому широко изучаются с помощью различных методов при различных заболеваниях, как у людей, так и у животных.

Данные форменные элементы имеют особенности: достаточно сложное строение, обладающие многочисленными свойствами и значением, что делает их ценными объектами для лабораторных исследований. Они достаточно чувствительны к среде, влияющие на их морфологию, изменяющие биохимические и морфофункциональные свойства [8, 9, 10, 127, 149].

Итак, достаточно высокая чувствительность атомно-силовой микроскопии со способностями измерять биофизические и морфофункциональные свойства образцов делает ее мощным, перспективным и уникальным инструментом для исследований форменных элементов при различных заболеваниях и в норме [122, 138].

На сегодняшний день имеется достаточно число исследований, направленных на морфометрические и биофизические параметры форменных элементов крови людей, как интактных, так и с различной патологией, с помощью АСМ. Однако, работ по сканированию форменных элементов животных (крупный рогатый скот), при помощи данной методики, в заграничных и отечественных источниках нам обнаружить не удалось.

Использование АСМ при исследовании агранулоцитов животных (в частности лимфоцитов) при патологии и без нее подразумевает новую стратегию описания и понимания биофизических и биохимических процессов, присутствующие в основе патологического изменения клеточных структур при различных кроветворных заболеваниях, что подтверждает высокую информативность АСМ и его значимость при исследованиях [14, 108, 123].

1.3. Применение цитохимических методов для изучения функциональных параметров лимфоцитов

Интерес ветеринарных специалистов к изучению метаболизма лимфоцитов крупного рогатого скота определен, с одной стороны, способностью данных клеток моментально реагировать на изменения

гомеостаза, с другой, проявляющуюся раньше перестройкой ферментативного состава лимфоцитов, чем количественные изменения в лейкоформуле и сывороточных белков крови [48].

Многими клинико-экспериментальными исследованиями доказано, что агранулоциты (лимфоциты) определяют действие иммунной системы и так же являются единой информационной системой, определяющей состояние макро и микроорганизма. Определенное место уделяется ферментативному статусу данных форменных элементов, который позволяет систематизировать и прогнозировать варианты с исходами как бактериальной, так и вирусной инфекции, что дает определенную возможность дальнейшей корректировки показателей резистентности [62, 65].

Ретровирусные заболевания крупного рогатого скота вызывают масштабные метаболические нарушения, определяющие тяжесть патологических процессов. Окислительно-восстановительные ферменты составляют большую группу из общего числа известных ферментов, контролируемые в организме энергетические процессы [72, 75, 90]. Значительную роль среди них являются дегидрогеназы, определяющие процессы гликолиза и дыхания [60, 86]. Данные операции, происходящие в организме, синтезируют богатые энергией фосфорные соединения, используемые для биосинтетических реакций [67, 95]. В клинической практике особый интерес проявляется к активности митохондриальных окислительно-восстановительных ферментов лимфоцитов, таких как α -глицерофосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [67, 91].

Цитохимический анализ определяет ферментативную активность как отдельных, так и целых клеточных популяций, в отличие от стандартных фундаментальных биохимических исследований, где считаются средние цифровые значения. Вполне логично предположить, что из клеточного пула клетки, при гемобластозах, имеют разные уровни функциональной

активности. Определение данной активности позволит структурировать различные клеточные субпопуляции, что даст представление о периоде, фазе течения того или иного заболевания, с дальнейшей возможностью прогнозирования, и обоснованной ступенчатой корректировкой, направленной на преобразования энергетического потенциала в как здоровых, так и измененных тканей [2, 32, 73].

Острые воспалительные процессы не инфекционной и инфекционной природы, любые стресс факторы вначале сопровождаются повышением активности митохондриальных ферментов, однако, переходя в хроническое течение производят истощение энергетического запаса со снижением активности данных ферментов [15, 60, 73].

Углеводам уделяется наибольшее значение среди различных веществ, которые поступают в клетку, для обеспечения энергетического потенциала [91, 100]. Катаболизм углеводов может происходить как по аэробному, так и по анаэробному пути [15]. Анаэробы получают энергию только за счет гликолиза. Эту способность сохраняют все анаэробные клетки за исключением головного мозга, поэтому осуществляют катаболизм, используя тканевое дыхание, способствуя переносу электронов от реорганизации органических молекул на молекулярный кислород [15]. В данном случае выход энергии на порядок выше чем при гликолизе. Ацетильные группы, образовавшиеся при расщеплении углеводов, вступают в цикл трикарбоновых кислот (цитратный цикл, цикл Кребса) и дальше реорганизуются до углекислого газа и атомов водорода, которые включаются в транспортировку молекулярного кислорода [15, 60, 62].

В число ферментов данного цикла входят изоцитрат дегидрогеназа (изолимонная кислота), сукцинатдегидрогеназа, а также малатдегидрогеназа (дегидрогеназа яблочной кислоты). Цитохимически наиболее интересна и важна активность сукцинатдегидрогеназы.

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) располагается на внутренней мембране митохондрий, из класса оксидоредуктаз и ускоряет дегидрирование янтарной

кислоты для образования фумаровой кислоты [40, 91, 100]. СДГ по структуре является флавопротеид и обнаруживается в бластных клетках. Регрессия активности СДГ выявляется при гемобластозах организмов.

Определено, что лимфоцит достаточно оперативно реагирует на воздействия иммуноактивными веществами изменением активности окислительно-восстановительных ферментов. Это определяет значимость энергетического метаболизма в реактивности иммунокомпетентных клеток. На вариации активности СДГ в агранулоцитах (лимфоцитах крупного рогатого скота) до и после использования иммуномодуляторов и иммунокорректоров будет изменяться чувствительность клеток, что позволяет выбрать препарат, обладающий наибольшей эффективностью с определением оптимального времени его применения [65, 86].

Анаэробный гликолиз регулируется рядом ферментативных реакций как в клетках костного мозга, так и периферической крови, в результате которых как глюкоза, так и гликоген трансформируется в глюкозо-6-фосфат, и распадается в две молекулы пировиноградной кислоты, а они в свою очередь в молочную [62]. Биологическое значение данного процесса в образовании определенного количества фосфорных соединений и веществ богатых энергией, используемых для синтеза. В данный процесс входят дегидрогеназы: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), α -глицерофосфатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфат. В лимфоцитах крупного рогатого скота найдены все ферменты гликолитической цепи [60].

α -Глицерофосфатдегидрогеназа (α -ГФДГ) определяется в двух формах: митохондриальная и цитоплазматическая. Первая α -ГФДГ расположена на внутренней мембране митохондрий, осуществляет перенос электронов в составе глицерофосфатного шунта, объединяющие аэробный и анаэробный процессы выработки и регуляции энергии. Вторая же α -ГФДГ ускоряет процессы трансформации глицерол-3-фосфата в дигидроксиацетонфосфат. Имеются данные, из гуманной медицины, о снижении активности данных α -ГФДГ при лейкозах и участках воспалительных процессов, которое

свидетельствует о глубоких отклонениях в окислительно-восстановительных реакциях [67, 75]. Периодичное чередование инфекционных процессов сопровождается развитием энергодефицитными состояниями со снижением функциональной активности иммунокомпетентных клеток из-за их энергетического состояния.

Активность ферментов в лимфоцитах зависит от течения ретровирусных заболеваний, формы и сочетанных патологий в организме. Агранулоциты являются мигрирующими, рециркулирующими клетками, способные отражать изменения как «энзиматическое зеркало», а цитохимический анализ ферментного статуса лимфоцитов - как опосредованная биопсия, позволяющая судить об обменных процессах органов и систем [15].

Таким образом, использование цитохимического анализа лимфоцитов дает информацию о функциональных метаболических обеспечениях иммунной системы, в данном случае при гемобластозах крупного рогатого скота. Это определяет большое значение при оценке работы и корректировки иммунной системы как при эксперименте, клиники, нормы, а также при патологии. Анализ данной литературы говорит, что сведения об активности дегидрогеназ лимфоцитарных клеток крови крупного рогатого скота крайне невелика, но при рассмотрении и изучении данных аспектов крайне важна.

1.4. Методы фракционирования крови

Для изучения морфологических, биофизических и функциональных параметров лимфоцитов, а также других форменных элементов периферической крови, необходимы достаточно эффективные способы их фракционирования [19, 21, 59].

Любой из методов фракционирования должен обладать несущественной степенью потерь клеток, при этом, отвечать высокой степени очистки с обязательным сбережением физиологической активности полученных клеток [21, 82, 96].

В структуре методов фракционирования клеток определены несколько принципов:

1. Выделение клеточных структур по их физическим свойствам, таким как размер или заряд выделяемых компонентов. К таким методам, характеризующихся на физических параметрах клеток выделяют: адгезию на стеклянной или пластиковой поверхности, а также центрифугирование в градиентах плотности [21, 33, 49].

2. Выделение клеточных структур по определению их поверхностных антигенов. Такие методы включают в себя: аффинную хроматографию, розеткообразование, цитолиз, пэннинг, клеточный сортер и иммуномагнитная сепарация [21, 33, 49].

Среди данных методов фракционирования крови большее распространение приобрели гравитационные методы, основанные на разной удельной плотности форменных элементов крови [21, 34]. При данных методах происходит распределение клеточных популяций следующим образом: эритроциты > нейтрофилы и эозинофилы > лимфоциты и моноциты > тромбоциты.

Для получения лейкоцитов крови применяется метод, характеризующийся смешиванием гепаринизированной крови с 6% раствором декстрана, также возможно применением 0,3% раствора желатина, в соотношении 1:5 [21, 99].

Производится отстаивание пробирки с данной смесью в течении 30-40 минут под определенным углом (45°) ° в термостате при температуре 37 °С, это необходимо для осаждения эритроцитов. Образовавшуюся плазму с лейкоцитами, выделяют, а оставшиеся эритроциты лизируют. Выделенные клетки очищают от остатков декстрана с помощью центрифугирования в растворе Хенкса, также для этого применима среда 199, при 1000 оборотов в минуту в течение 3-5 мин [21, 33, 74].

Метод *Woym*, известный с 1968 года, используется для выделения мононуклеарных клеток периферической крови. Данный метод

характеризуется способностью оседания выделяемых частиц дисперсной фазы под воздействием гравитационного поля, а также центробежных сил в градиенте плотности фиколл-урографина. В данном способе выделения клеточных популяций фиколл является компонентом, объединяющим эритроциты, а урографин является компонентом для образования изотоничности и необходимой плотности [19, 21, 59]. При этом периферическую кровь наслаивают на данный градиент. Наслоенная кровь, некоторое время, удерживается над градиентом, после чего эритроциты с гранулоцитами, имеющие наибольшую плотность, чем седиментирующий раствор, склеиваются фиколлом и транспортируются на дно пробирки. При этом агруноциты с моноцитами фиксируются в интерфазе, производится их транспортировка в другую пробирку с последующим отмыванием центрифугированием. Чистый выход мононуклеаров, при данном способе, составляет не более 90%.

Для фракционирования моноцитов тоже используется метод Воуп (1968), а также способы с адгезированием к стеклянной или пластиковой поверхности с последующим очищением, с помощью питательной среды, центрифугированием [21, 33, 74].

Для выделения нейтрофилов из периферической крови используется центрифугирование в двойном градиенте плотности фиколл-урографина. При этом необходимо соблюдать температурный режим в 4°C для проведения данных манипуляций, это условие обусловлено предотвращения активации нейтрофилов в процессе фракционирования [21, 99].

В данном способе применяется фиколл-урографин $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$. Первоначально в пробирку для центрифугирования наносится фиколл-урографина с плотностью $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$, после наносится фиколл с другой плотностью $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ и в конце наслаивается периферическая кровь исследуемого пациента на двойной градиент и центрифугируется в течении 30-45 минут (400 g). По окончанию центрифугирования образуются

кольца мононуклеаров (верхнее кольцо) и нейтрофилов (нижнее кольцо), на дне оседают эритроциты [21, 82].

Необходимо транспортировать нейтрофильное кольцо в чистую пробирку со средой не содержащую ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и несколько раз центрифугировать в течении 10 минут (200 g). Чистый выход нейтрофилов, при данном способе, составляет не более 95%.

Уже с 1970 годов стал известен метод проточной цитофлуориметрии. На сегодняшний день, данный способ широко распространен в медицинских и биологических исследованиях. Он характеризуется способностью определения фенотипа каждой клетки, дающий полную информацию анализируемых субпопуляций [21, 59, 82].

В начале производится окрашивание всех исследуемых клеток с помощью флуоресцентного красителя, после их транспортируют с потоком буферного раствора (PBS) через вибрирующую проточную камеру с форсункой.

Каждая проходящая, через проточную камеру, капля исследуемой жидкости содержит клетки. Все исследуемые клетки освещаются лазером (источник света) и рассеивают его. Данное рассеивание фиксируется и регистрируется при помощи фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) [21, 34].

Рассеяние пучка света (лазера) под наименьшими углами, называемое передним рассеянием «forward scatter», необходимо для выявления размеров клетки, а рассеяние света под углом 90° , называемое боковым рассеянием «side scatter», дает способность регистрировать соотношения размеров ядра и цитоплазмы, а также присутствие гранул в клетке [21, 34].

Данный метод способен распределить анализируемую периферическую кровь на субпопуляции лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов и эритроцитов. При этом возможен анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов выделяемых клеток, но с применением моноклональных антител к ним, конъюгированных разнообразными флуоресцентными метками [21].

Благодаря проточной цитофлуориметрии известен также метод проточной цитометрии, способный производить сепарацию клеток [21].

Обработанные данным способом клетки диффундируют в жидкость, которой придается заряд (положительный или отрицательный).

При этом происходит электризация флуоресцирующих клеток положительным зарядом, а нефлуоресцирующих отрицательным зарядом. После, данная жидкость, с исследуемыми клетками, проходит через противоположно заряженные электроды с последующим распределением клеточных структур (противоположные знаки взаимно притягиваются).

Степень чистоты клеточных популяций, фракционированных при помощи клеточного сортера доходит до 99%. Данный метод способен выделять фракции как помеченных, так и немеченых субпопуляций с существенным процентом выхода клеточных структур.

При этом сохраняется жизнеспособность клеток для дальнейших экспериментов и исследований. Промывка клеточной суспензии занимает сравнительно около 30-40 минут. Выделенные клеточные структуры можно использовать в последующих исследованиях с помощью различных методов, также возможна культивация *in vitro* [21].

Говоря о минусах проточной цитофлуориметрии можно отметить дороговизну аппаратуры, расходных и комплектующих материалов, поэтому есть необходимость в корректировке и совершенствовании одного из методов фракционирования крови для проведения исследований морфологических, биофизических и функциональных параметров клеточных субпопуляций.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили пробы цельной крови, а также фракции лимфоцитов крови крупного рогатого скота. Все экспериментальные образцы были получены от лактирующих коров чернопестрой породы 4-5 летнего возраста из хозяйств Тамалинского района Пензенской области (СПК «Мартынов», КХ «Заря», ИП КХФ «Князькова») и Татищевского района Саратовской области (ИП КХФ «Солтабиев Х.А.»).

Научно-исследовательская работа включала в себя 3 этапа.

На первом этапе, на основании результатов молекулярно-генетических исследований и данных госветслужбы, были сформированы группы животных и определен их гематологический статус (рис. 1).

Первую группу составлял клинически здоровый интактный крупный рогатый скот, отрицательный, по данным госветслужбы, в реакции иммунодиффузии (РИД) относительно *BLV*- специфических АТ и в полимеразной цепной реакции (ПЦР) относительно *BIV*- и *BLV*- провирусной ДНК (n=35). Во вторую, третью и четвертую группы были включены *BLV*- (n=86), *BIV*- (n=84) и *BLV/BIV*- позитивные (n=83) по результатам ПЦР-исследований коровы, соответственно. Все группы животных были сформированы по принципу аналогов.

Кровь отбирали из подхвостовой вены коров с использованием вакуумных систем с пробирками для гематологических исследований (ЭДТА - К3) и пробирками для исследования сыворотки Improvacuter (SiO₂). Транспортировка осуществлялась с соблюдением «холодовой цепи» в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре + (2 - 10)°С.

Для экстракции и очистки НК применяли набор «ДНК Сорб В» (ИЛС, Россия). Наличие или отсутствие *BLV*-провируса в стабилизированной периферической крови коров констатировали методом классической ПЦР с

использованием набора ЛЕЙКОЗ (ИЛС, Россия), а провируса *BIV* - методом мультиплексной ПЦР (патент РФ на изобретение № 2615465 от 04.04.2017 г.) [38]. Синтез праймеров осуществляли в ЗАО «Синтол» (Россия). Для постановки реакции и ее учета использовали набор ПЦР-Микс с буфером для внесения (НПФ «Литех», Россия). Амплификация проводилась в термоциклере T100, а детекция продуктов амплификации - на оборудовании GelDoc XR (BioRad, США). Учет реакции проводили методом горизонтального электрофореза с применением набора «ЭФ» (ИЛС, Россия).

Используемый нами гематологический анализатор MicroCC20Vet Auto Hematology Analyzer (HTI, USA) позволяет измерить 20 параметров клинического анализа крови. Однако, по нашему мнению, выдаваемые прибором усредненные показатели: триада MID (mon, ba, eo), 10^9 г/л; гранулоциты GRA (neutrophils), 10^9 г/л; относительная концентрация триады MID, % и относительная концентрация гранулоцитов GRA, % являются недостаточно информативными при гематопатологических состояниях, особенно при энзоотическом лейкозе крупного рогатого скота. По этой причине мы учитывали следующие показатели прибора: эритроциты (RBC), 10^{12} /L; гемоглобин (HGB), g/L; средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), g/L; среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), pg; ширина распределения эритроцитов по объему (RDW), %; средний объем эритроцита (MCV), fL; гематокрит (HCT), %; содержание тромбоцитов (PLT), 10^9 /L, средний объем тромбоцитов (MPV), fL; тромбоцитрит (PCT), % и ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW), %.



Рисунок 1 – Определение гематологического статуса животных

Содержание в крови исследуемых животных основных групп лейкоцитов: лимфоциты $10^9/L$; базофилы $10^9/L$; эозинофилы $10^9/L$; палочкоядерные нейтрофилы $10^9/L$; юные нейтрофилы $10^9/L$; сегментоядерные нейтрофилы $10^9/L$ и моноциты, $10^9/L$ было отдельно посчитано на счетчике лейкоцитарной формулы СЛФ-ЭЦ-01-09 (Россия). Для этого в окрашенных набором Лейкодиф 200 свежих мазках крови подсчитывали по 25 лейкоцитов в каждом из 4-х сегментов мазка при зигзагообразном перемещении стекла. Микроскопию осуществляли на световом бинокулярном микроскопе Биомед 5 (Россия) при увеличении в 1000 крат (100x10).

Показатель скорости оседания эритроцитов (СОЭ), мм/ч рассчитывали по стандартной методике Панченкова с использованием СОЭ-метра (капиллярных пробирок).

На биохимическом анализаторе BioChemSA (USA) полуавтоматического типа, с применением реагентов линейки Диакон-ДС

(АО «ДИАКОН-ДС», Россия), определяли биохимические параметры крови исследуемых животных: билирубин прямой и общий, мкмоль/л; активность аланинаминотрансферазы (АСТ), ЕД/л; активность аспартатаминотрансферазы (АЛТ), ЕД/л; белок общий, г/л; альбумин, г/л; щелочная фосфатаза (ЩФ), ЕД/л; креатинин, мкмоль/л; мочевины, мкмоль/л.

Вторым этапом исследований стало изучение влияния ретровирусных заболеваний на биофизические и морфологические параметры лимфоцитов крупного рогатого скота, в соответствии с гематологическим статусом исследуемых животных (рис. 2).

Изоляцию фракции лимфоцитов выполняли по оригинальной авторской методике (Решение о выдаче патента от 03.04.2020 по заявке 2019110642 от 10.04.2019) [84]. Центрифугирование крови осуществляли на оборудовании Eppendorf Cetrifuge 5804 R, процедура фракционирования проводилась в условиях бокса для стерильных работ (Biocom) с использованием одноканального механического дозатора (Biohit, Sartorius). Лимфоцитарную взвесь приготавливали на стерильном PBS в соответствии со стандартом мутности МакФарланда (McFarland Standard 0.5).

Для АСМ-сканирования, лимфоцитарную взвесь наносили на чистое обезжиренное покровное стекло и равномерно распределяли стерильной платиновой петлей, осуществляли адгезию клеток в течение 30 минут во влажной камере при 37°C и фиксировали безводным метанолом в течение 5 минут при комнатной температуре. Для измерения морфо-биофизических параметров клеток использовали сканирующий атомно-силовой микроскоп фирмы «NT-MDT» модель Solver P47 PRO (Зеленоград, Россия). Принцип метода: saniрующий модуль атомно-силового микроскопа имеет титановый наконечник с радиусом закругления 10 нм, который закреплен на кантилевере. Источник лазера - луч, который сканирует положения кантилевера как в перпендикулярной и параллельной плоскостях, являясь считывающим устройством микроскопа; CRM система автоматически строит

трехмерные модели от получаемых сигналов движения кантилевера. В начале определяли фрагмент однослойного фрагмента клеток на покровном стекле 1,0x1,0 см, который вырезали и фиксировали в микроскопе. Для сканирования применяли резонансный метод с частотой 300 кГц. На каждом биообразце определялись по пять лимфоцитов, при этом упругость каждой клетки определяли в 9 точках, ригидность мембран устанавливали с помощью метода силовых кривых при применении режима спектрометрии.

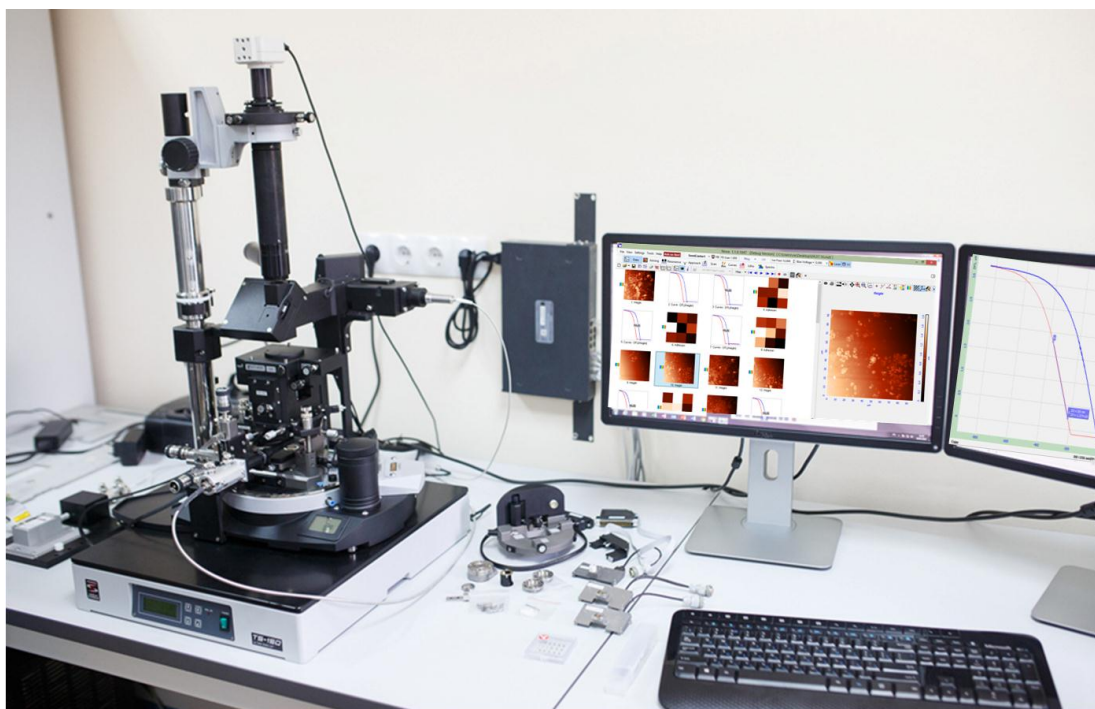


Рисунок 2 – АСМ-сканирование агранулоцитов крови

Расчёт модуля Юнга (модуль упругости) строился по модели Герца. Сила контактного взаимодействия зонда определяется формулой:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E * \Delta h^{1,5}$$

F - сила, влияющая на биообразце; R - радиус зонда; Δh - глубина прохождения в поверхность; E - модуль упругости (МЮ).

Благодаря радиусу закругления кантилеверов, используемые в анализе, складывается формула определения модуля Юнга:

$$E = 7,5 * 10^{-3} * \frac{F}{\Delta h^{1,5}}$$

E- модуль упругости (МЮ); F - Δy силового графика; Δh - Δx силового графика.

Вычислялись средние значения МЮ каждого из исследованных пяти серий биологических образцов. Полученные средние значения МЮ лимфоцитов распределялись с шагом в 0,4 КПа. Определялось процентное количество значений модуля Юнга клеток. Данные числовые параметры регистрировались в формулы лимфоцитарной популяции соответственно с разным иммунологическим статусом.

Далее, с помощью программного обеспечения «Debug Nova_1.1.0.1847», измеряли диаметр, высоту, объем, шероховатость и адгезию лимфоцитов крупного рогатого скота, оценивалась их форма.

Статистическую обработка данных осуществляли в программном обеспечении «Statistica 8.0» по правилам параметрической статистики. Полученные результаты оценивали в соответствии с критериями достоверности. В процессе исследования использовались статистические параметры: среднее арифметическое значение; стандартная ошибка; 95% доверительный интервал; вариационный коэффициент; стандартное отклонение; критерий Бонферрони для однофакторного дисперсионного анализа для оценки различий 3-х и более групп. Для интерпретации показателей двух групп использовался критерий t ($p < 0,05$).

Третьим этапом исследований стало изучение влияния ретровирусных заболеваний на метаболические и физиологические параметры лимфоцитов крупного рогатого скота, в соответствии с гематологическим статусом исследуемых животных (рис. 3).

Для функциональных исследований проб с помощью МТТ – теста исследовали взвесь агранулоцитов крупного рогатого скота с разным гематологическим статусом. Для реализации теста готовили рабочий раствор тетразолиевого синего бромида (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид), с помощью разбавления дисперсного порошка

фосфатно-солевым буфером (PBS) из расчета 3 мг/мл. Для взвешивания использовали электронные лабораторные весы OHAUS Discovery DV214C (Швейцария). Лимфоцитсодержащий материал, в соотношении 1:1 (1,0 мл), смешивали с рабочим тетразолиевым синим бромидом, с последующим шейкерованием, с экспозицией 1 час при температуре 37°C на шейкере-инкубаторе настольного типа Environmental Shaker-Incubator ES – 20. После центрифугирования на Eppendorf Cetrifuge 5804 R при 1500 об/мин в течение 5 минут удаляли надосадочную жидкость и добавляли биполярный апротонный растворитель диметилсульфоскид (ДМСО, РЕАХИМ) в каждую пробу. Под действием дегидрогеназ в цитозоле клетки, нерастворимый пурпурный формазан преобразовывался в цветной раствор. По построенному калибровочному графику определяли концентрацию формазана в мкг/мл раствора. Зная количество клеток (лимфоцитов) в данном объеме раствора, проводили пересчет на одну живую клетку (нг/лимфоцит).

Для определения соотношения кислотных и щелочных компонентов клеток, характеризующего их физиологический статус, равномерно распределяли и высушивали 1 каплю клеточной взвеси агранулоцитов на чистом обезжиренном предметном стекле. Фиксировали и окрашивали полученный препарат набором реагентов Лейкодиф 200 (LDF 200) по стандартной методике. Для спектрального анализа выбирали участки препарата с равномерным монослоем клеток на стекле. Спектральный анализ агранулоцитов осуществляли с помощью универсального цветоанализатора микроскопа-спектрофотометра ЛОМО МСФУ-К (Россия). Замеры производили при использовании штатного монохроматора МСФУ-К при мощности 800А с шагом измерения 0,5 нм и диаметром точки сканирования 10-4 мм при 480-и кратном увеличении (12x40). Регистрировали величину интенсивности поглощения светового пучка (I_λ) в видимой области спектра при спектральной ширине ($\delta\lambda$) 350 - 700 нм. По полученным данным определяли степень поглощения окрашенных лимфоцитов в спектре эозина У и азура II, являющихся основными красящими компонентами системы.

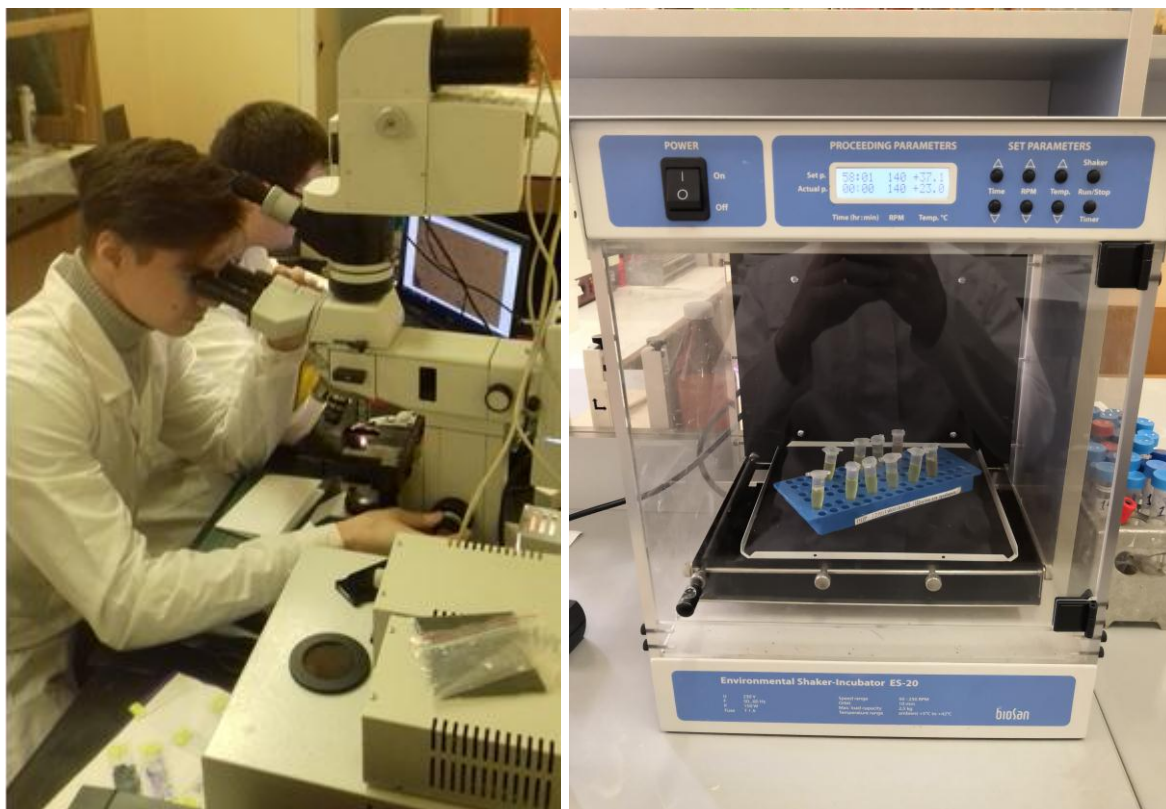


Рисунок 3 – Фотометрический анализ агранулоцитов крови

Эозин У, входящий в состав набора для окрашивания «Лейкодиф 200», относят к кислотным красителям, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной (белковой) природы. Спектр поглощения чистого органического красителя эозина – 470 нм. Другой компонент красящего раствора, азур II, является основным красителем, используется для окраски структур, богатых нуклеиновыми кислотами (ядра, ядрышки, рибосомы), а также аморфного компонента межклеточного вещества. Азур II – двухкомпонентный сложный краситель, спектр поглощения которого находится в диапазоне 620-665 нм. При окрашивании биологических объектов часто наблюдается явление метахромазии, что может быть связано с взаимодействием красителей между собой и зависит от кинетики биологических процессов в клетке, поэтому диапазон поглощения может несколько варьировать. Так область поглощения для эозина У в биологических объектах начинается уже с 360 нм, а для азура II – с 580 нм [165].

Статистическая обработка цифровых данных включала определение средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m). Отличие контрольной и опытных групп определяли статистически достоверными при $P \leq 0,05$.

Научно исследовательская работа выполнялась в соответствии с нижеуказанной схемой:



Рисунок 4 – Схема исследования

2.2. Результаты исследований и их обсуждение

Данный раздел включает в себя результаты научных исследований, опубликованных в 13 научных статьях [11-16, 49-52, 107, 108, 136] и одном патенте [89].

2.2.1. Гематологический статус исследуемых животных, как индикатор адаптивного иммунитета

Важнейшим защитным барьером при борьбе с инфекциями является гемопоэтическая система. При этом значимым является не только само наличие, но и соотношение компонентов крови, так как это определяет все происходящие в организме процессы. Изучение коррелятивной связи между гемограммой и биохимическими показателями крови крупного рогатого скота при гематопатологических процессах позволяет определить характер течения инфекции и выявить степень дегенеративных явлений на всех уровнях организации, начиная с молекулярного и заканчивая гомеостазом организма в целом, если вести речь об отдельно взятом животном, а также выявить тенденции, сформированные на популяционном уровне при компаративном межгрупповом анализе.

Для изучения корреляции, на основании данных госветслужбы (РИД-исследования) и результатах собственных исследований (ПЦР-диагностика) были сформированы четыре группы животных. В первую группу входил клинически здоровый интактный крупный рогатый скот (n=35). Во вторую, третью и четвертую группы были определены *BLV*- (n=86), *BIV*- (n=84) и *BLV/BIV*- позитивные (n=83) животные, соответственно. Все группы были сформированы по принципу аналогов.

Результаты исследования гематологического статуса животных представлены в таблицах 1 (общий анализ крови) и 2 (биохимические исследования крови), а наиболее характерные тенденции по группам проиллюстрированы на рисунках 5 - 9.

Таблица 1 - Клинический анализ крови интактных и инфицированных ретровирусами животных, (M±m)

Показатели	Интактные животные	<i>BLV</i> -инфицированные животные	<i>BIV</i> -инфицированные животные	<i>BLV/BIV</i> -инфицированные животные	Референсные значения
Эритроциты (RBC), 10 ¹² /L	6,2±0,2	3,7±0,3#*	5,1±0,4#*	2,7±0,3#*	5,0-10,0
Гемоглобин (HGB), g/L	125,0±5,0	83,0±5,0#*	98,0±6,0#*	55,0±6,0#*	80,0-150,0
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), g/L	320,0±20,0	390,0±20,0#*	310,0±30,0	290,0±30,0	300,0-370,0
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), pg	14,0±1,0	17,0±1,1#*	20,0±1,4*	23,0±1,7*	13,0-19,0
Средний объем эритроцита (MCV), fL	42,5±3,0	64,5±3,0#*	39,2±2,0#	52,4±2,0#*	38,0-53,0
Ширина распределения эритроцитов по объему (RDW), %	15,0±1,1	17,0±1,2*	18,0±1,4*	19,0±1,3*	14,0-19,0
Гематокрит (HCT), %	55,0±5,0	35,0±3,0#	44,0±4,0#	29,0±3,0#*	28,0-46,0
СОЭ, мм/ч	3,0±1,0	6,0±2,0*	7,0±1,0*	8,0±2,0*	0,1-5,0
Тромбоциты (PLT), 10 ⁹ /L	390,0±15,0	230,0±10,0#*	160,0±8,0#*	74,0±6,0#*	120,0-820,0
Средний объем тромбоцита (MPV), fL	6,2±1,0	5,2±1,2#*	3,8±0,9#*	2,2±0,9#*	3,8- 7,0
Ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW), %	17,0±2,3	15,3±1,7#	11,0±1,2*	9,9±1,0*	10,0-18,0
Тромбоцит (PCT), %	0,3±0,01	0,2±0,01#*	0,1±0,01*	0,1±0,01*	0,1-0,5
Лейкоциты (WBC), 10 ⁹ /L	9,3±0,3	15,6±1,9#*	6,8±0,4#*	3,1±0,2#*	4,0-12,0
Лимфоциты, 10 ⁹ /L	56,0±2,0	72,8±4,6*	28,3±3,2#*	69,3±2,5*	45,0-75,0

Эозинофилы, 10 ⁹ /L	3,0±1,0	1,4±0,2#*	5,2±1,1#*	2,9±0,3	2,0-20,0
Базофилы, 10 ⁹ /L	0,1±0,1	1,3±0,3#*	2,0±1,0*	2,0±1,0*	0,1-2,0
Юные нейтрофилы, 10 ⁹ /L	0,0±0,0	3,2±0,6#*	1,8±0,8#*	3,3±0,6#*	0,0-1,0
Палочкоядерные нейтрофилы, 10 ⁹ /L	4,0±1,0	3,5±0,5#*	8,4±2,4#*	3,7±0,3*	0,0-5,0
Сегментоядерные нейтрофилы, 10 ⁹ /L	33,0±2,0	11,6±2,2#*	47,8±3,5#*	10,9±0,5#*	15,0-45,0
Моноциты, 10 ⁹ /L	4,0±1,0	2,4±0,2#*	6,5±1,8#*	3,6±0,2#	2,0-5,0

*Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп; # - статистически значимые различия опытных групп между собой ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)*

Как следует из данных, представленных в таблице 1, морфологические параметры периферической крови здоровых животных, располагались в пределах физиологической нормы, однако, количество эритроцитов и гемоглобина в крови *BLV*-, *BIV*- и *BLV/BIV*- инфицированных животных было снижено в 1,7 и 1,5; 1,2 и 1,3; 2,3 раз соответственно, по сравнению с группой интактных животных. Примерно на том же уровне снижался показатель гематокрита в экспериментальных группах. При этом среднее содержание гемоглобина в эритроцитах инфицированных животных напротив возрастало в 1,2; 1,4 и 1,6 раз соответственно по сравнению с контролем, хотя средняя концентрация гемоглобина в эритроците увеличивалась на 18% лишь в группе *BLV*-инфицированных животных. Средний объем эритроцитов был больше у животных II и IV групп в 1,5 и 1,2 раз соответственно, и ширина распределения эритроцитов по объему несколько увеличивалась во всех экспериментальных группах, при том, что эти 2 показателя находились в пределах референсных значений.

Следует отметить, что в крови *BLV*-, *BIV*- и *BLV/BIV*- инфицированных животных было снижено количество тромбоцитов в 1,7; 2,4 и 5,3 раз соответственно по сравнению с контролем, на фоне уменьшения среднего

объем тромбоцита в 1.2-2.8 раз. Показатели ширины распределения тромбоцитов по объему и тромбокрит были несколько снижены в экспериментальных группах, но находились в рамках референсных значений.

Для *BLV*-инфицированных животных было характерным увеличение содержания лейкоцитов в 1,7 раз, по сравнению с животными контрольной группы. При том, что количество лимфоцитов у животных II и IV групп было выше на 30%, чем у животных контрольной группы и находилось в верхних пределах референсных значений, а у животных III группы, напротив, содержание лимфоцитов было более чем 2 раза снижено, по сравнению с контролем и нижними пределами референсных значений. Следует отметить, что количество юных форм нейтрофилов во всех экспериментальных группах животных было выше, чем в контроле: в 1,7 раз во II и IV группах и в 2,6 раз в III группе, на фоне возрастания показателя СОЭ во всех экспериментальных группах в 2-2,7 раз по отношению к контролю. Кроме того, содержание эозинофилов и моноцитов в III группе животных было больше в 1,7 раз по сравнению с контролем. Содержание базофилов в экспериментальных группах животных находилось в верхних границах референсных значений.

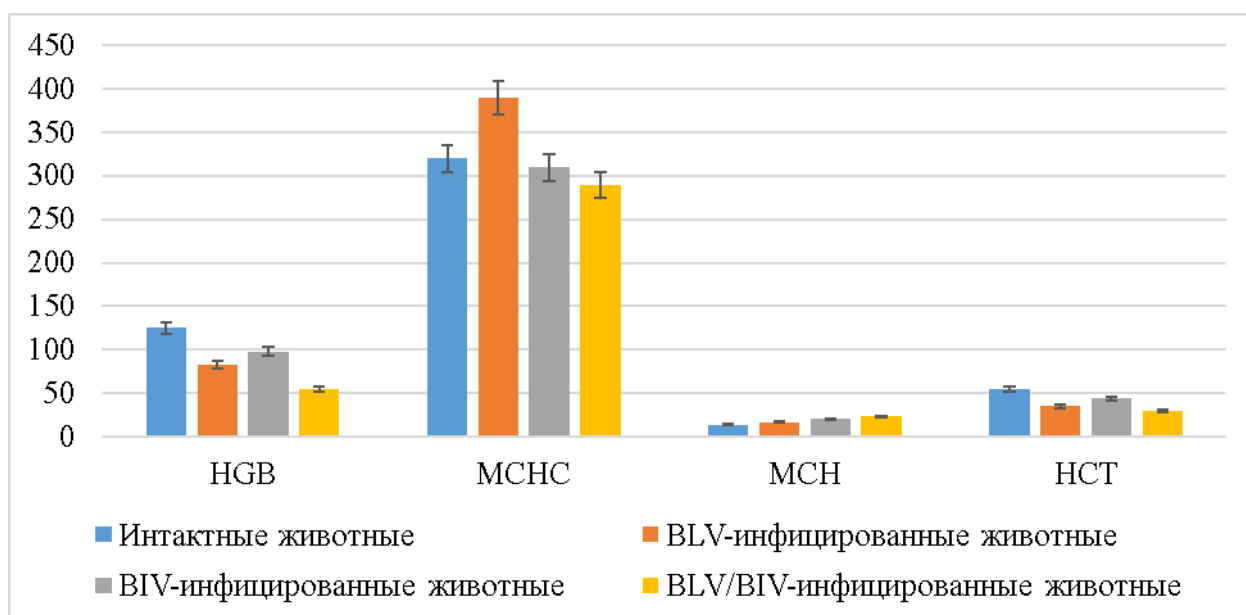


Рисунок 5 – Показатели, характеризующие содержание гемоглобина в крови животных (HGB и MCHC - g/L, MCH – pg, HCT - %)

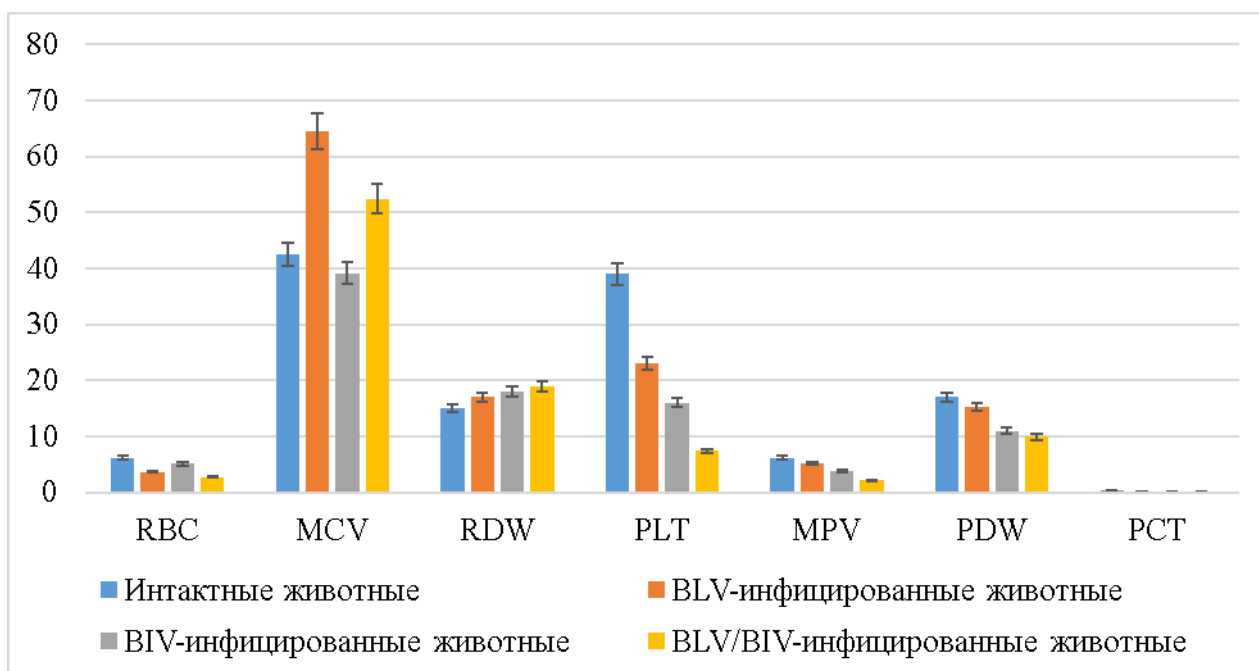


Рисунок 6 – Показатели, характеризующие эритроциты и тромбоциты в крови животных (RBC- 10^{12} , PLT- 10^{10} , MCV и MPV-fL, RDW, PDW и PCT-%)

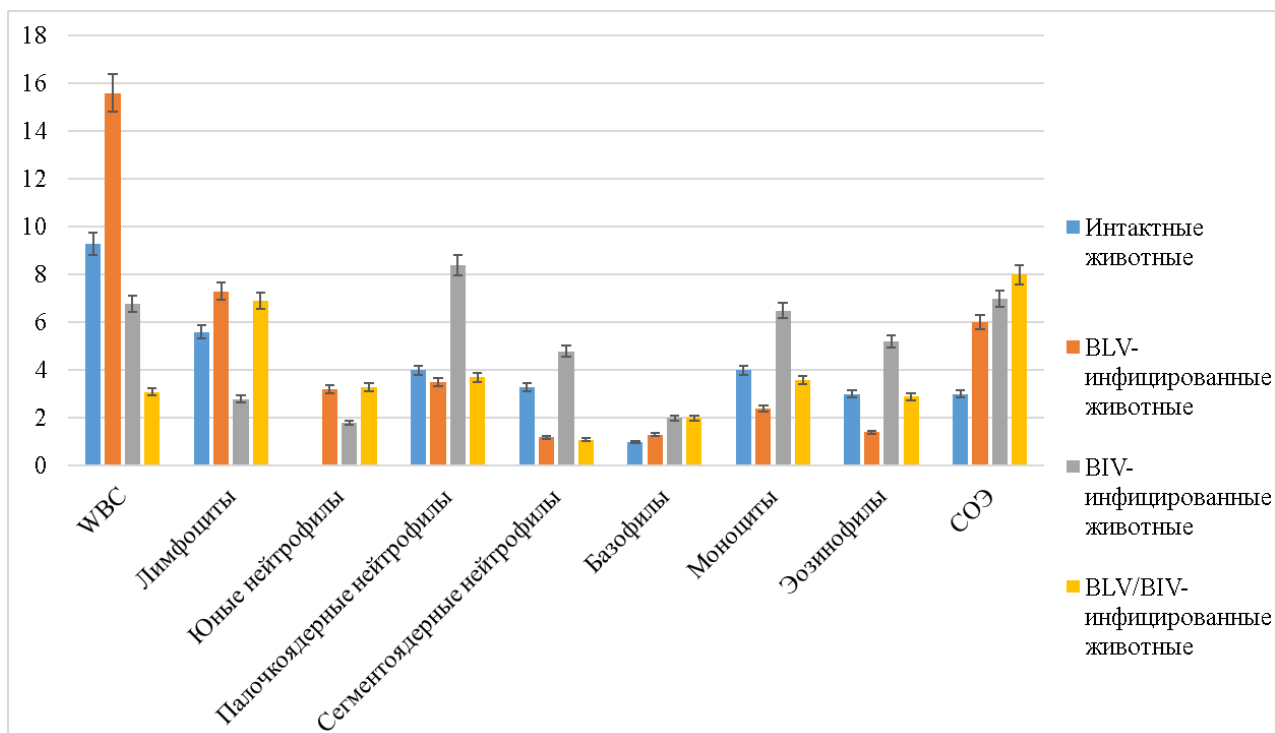


Рисунок 7 – Показатели, характеризующие лейкоцитарную фракцию крови животных (лимфоциты и сегментоядерные нейтрофилы - 10^{10} , СОЭ – мм/ч, остальные показатели - 10^9)

Сравнительный анализ показателей межгрупповой динамики ОАК исследуемых животных позволяет нам предполагать присутствие

гиперхромной анемии в экспериментальных группах, которая может носить компенсаторный характер и быть связана с разрушением эритроцитов, о чем свидетельствует возрастающий показатель ширины распределения эритроцитов по объему на фоне снижения величины гематокрита и абсолютного содержания эритроцитов в крови.

Тромбоцитопения при снижении среднего объема тромбоцитов является маркером гипопластических процессов, причиной которых может стать вирусобусловленное повреждение системы кроветворения.

Лимфопения также является специфическим маркером вирусного иммунодефицита у животных, в то время как сдвиг нейтрофильного ядра влево на фоне лейкоцитоза служит неспецифическим признаком любого воспалительного процесса в организме животного, а моноцитоз и эозинофилия часто сопровождают хронические воспалительные процессы.

Таблица 2 - Биохимический анализ крови интактных и инфицированных ретровирусами животных, ($M \pm m$)

Показатели	Интактные животные	<i>BLV</i> -инфицированные животные	<i>BIV</i> -инфицированные животные	<i>BLV/BIV</i> -инфицированные животные	Референсные значения
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,5±0,5	5,3±0,8#*3.5	3,1±0,4#*2.1	8,4±0,6##*	0,0-5,0
Билирубин общий, мкмоль/л	5,6±0,9	15,6±1,9##*	6,8±0,8##*	18,5±0,7##*	0,7-14,0
АСТ, ЕД/л	29,4±2,2	47,4±2,6*	48,2±2,2*	97,3±2,8##*	45,0-110,0
АЛТ, ЕД/л	44,3±2,5	66,1±3,1##*	91,4±3,9##*	153,2±3,6##*	6,9-35,0
Белок общий, г/л	78,0±5,0	98,5±4,6##*	63,7±5,2##*	31,2±1,2##*	62,0-82,0
Альбумин, г/л	37,0±4,0	20,2±3,1*	24,1±3,3##*	21,4±1,9*	28,0-39,0
ЩФ, ЕД/л	57,3±2,3	230,0±15,0##*	120,0±10,0##*	45,2±1,7##*	18,0-153,0
Креатинин, мкмоль/л	65,1±2,9	124,4±5,1*	124,4±5,3*	136,4±6,2##*	56,0-162,0
Мочевина, мкмоль/л	5,8±0,6	9,3±0,7##*	7,5±0,8##*	18,3±0,9##*	2,8-8,8

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп; # - статистически значимые различия опытных групп между собой ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10).

Из данных, представленных в таблице 2 следует, что биохимические показатели крови интактных животных, находились в пределах физиологической нормы. Группа *BLV*- инфицированных животных, по биохимическим показателям, характеризовалась повышенным содержанием желчных пигментов: прямого и общего билирубина в 3,5 и 2,8 раз в сравнении с интактными. При этом наблюдалась гипоальбуминемия (45,4%) на фоне повышения общего белка (26,3%). Активность щелочной фосфатазы возрастала в 4 раза, в то время как активность аминотрансфераз (АСТ и АЛТ) увеличивалась менее значительно: в 1,6 и 1,5 раз по сравнению с контролем, при сохранении коэффициента де Ритиса в пределах нормы. Содержание креатинина находилось в верхних пределах референсных значений, а мочевины - чуть выше, значения этих показателей превышали в 1,9 и 1,6 раз соответственно, таковые у интактных животных.

Биохимические исследования сыворотки крови *BIV*- инфицированных животных выявили снижение показателей белковой фракции: общего белка (19,2%) и альбумина (35,1%). Отмечено повышение активности щелочной фосфатазы в 2,1 раза, аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в 1,6 и 2 раза при сохранении нормы коэффициента де Ритиса. Содержание креатинина и мочевины хотя и находилось в верхних границах нормы, все же превышало таковые показатели у животных контрольной группы в 1,9 и 1,3 раз соответственно. Содержание прямого и общего билирубина также находилось в пределах референсных значений, но по сравнению с интактными животными возрастало в 2 и 1,2 раз соответственно.

Что касается микст-инфицированных ретровирусами животных, в их сыворотке отмечали уменьшение общего белка (2,5 раза) и альбумина (в 1,8 раз) на фоне значительного увеличения общего и прямого билирубина (3,3 и 5,6 раз соответственно), роста содержания мочевины (3,2 раза) и креатинина (2,1 раза) в сравнении со здоровым крупным рогатым скотом. Активность ферментов АСТ и АЛТ у этих животных возрастала в 3,5 и 3,3 раза

соответственно, а щелочной фосфатазы, напротив, снижалась в 4 раза по сравнению с интактными.

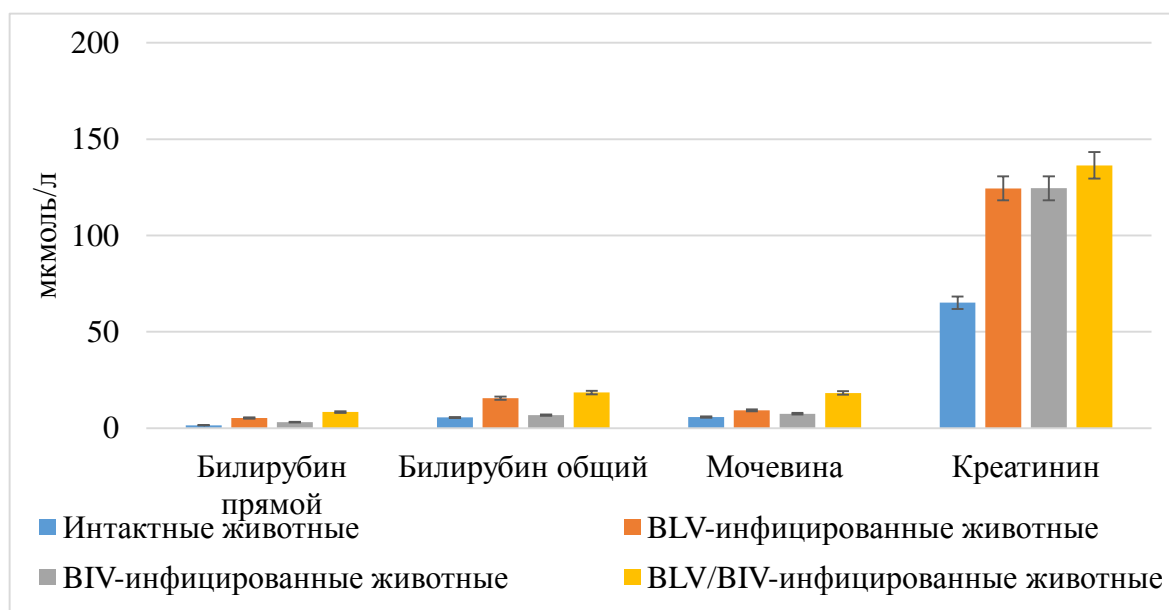


Рисунок 8 –Биохимические показатели крови исследуемых животных

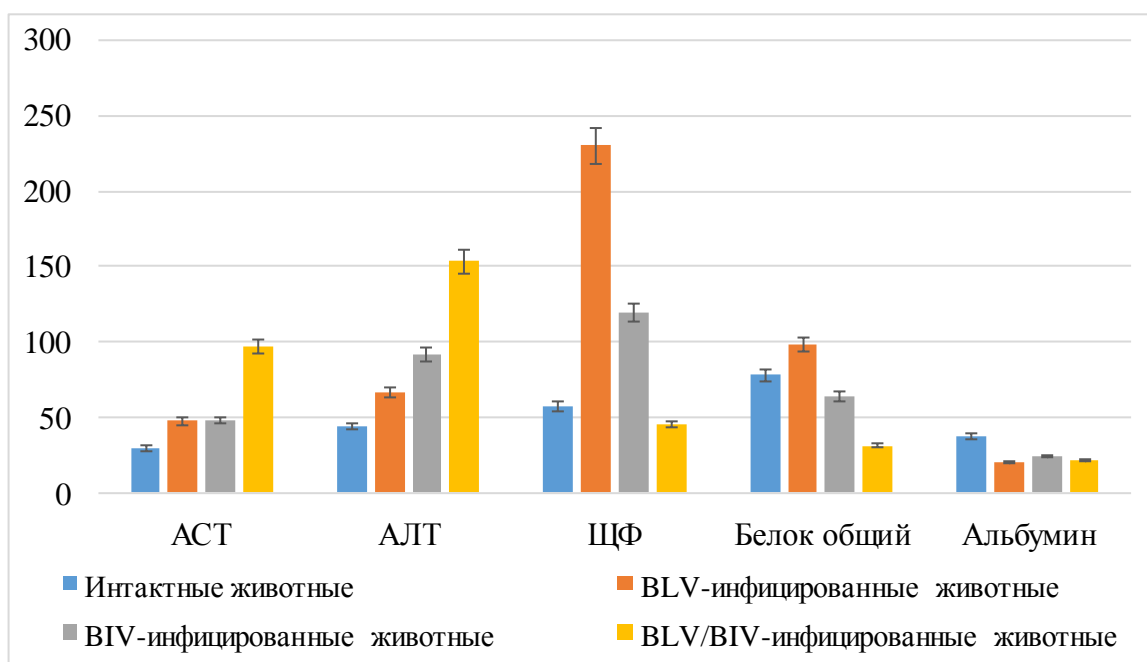


Рисунок 9 –Биохимические показатели крови исследуемых животных (АСТ, АЛТ и ЩФ - ЕД/л; белок общий и альбумин - г/л)

Сравнительный межгрупповой анализ динамики биохимических показателей сыворотки крови исследуемых животных выявил развитие у

животных экспериментальных групп такие маркеры почечной недостаточности, как увеличение содержания креатинина и мочевины на фоне снижения альбумина. При этом рост фракции общего белка во II группе животных свидетельствует о прогрессировании инфекционного процесса, так как увеличение происходит за счет фракции глобулинов. Снижение содержания общего белка в сыворотке крови *BLV*- и микст-инфицированных животных может быть маркером преобладания катаболических процессов над анаболическими. Рост активности аминотрансфераз во всех экспериментальных группах относительно контроля свидетельствует о развитии деструктивных процессов в печени, вероятно, в результате интоксикации.

Вопрос гематопатологии при вирусном иммунодефиците крупного рогатого скота изучен недостаточно, однако полученные нами данные относительно *BLV*-инфицированных животных коррелируют с результатами других исследователей [112]. В настоящее время выявлено 10 генотипов *BLV*, каждый из которых включает в себя несколько субтипов, которые, в свою очередь, подразделяются на варианты [129]. Что касается *BIV*, относящегося к группе лентивирусов, его склонность к генетическим трансформациям привела к тому, что одни ученые констатируют присутствие данного патогена в популяции животных при полном отсутствии патологического эффекта. Однако, серологически гомологичный ему возбудитель болезни Джембрана, появившийся в результате мутации *BIV* вызывает остро протекающую смертельную болезнь у крупного рогатого скота на Бали [111, 119]. Разные исследователи констатируют различную степень микст-инфицирования крупного рогатого скота ретровирусами [46, 52, 53, 84, 115]. Таким образом, компаративный межгрупповой анализ способствует выявлению характерных тенденций при гематопатологических состояниях у животных на популяционном уровне в каждом конкретном случае, что позволяет прогнозировать развитие эпизоотического процесса на данной территории.

Традиционно для оценки иммунного статуса животных используют исследование цитокинового профиля и специфические реакции иммунитета. В своих исследованиях мы используем иной, несколько упрощённый, но не менее информативный подход. Рассматривая гематологический статус исследуемых животных с позиции анализа состояния их адаптивного иммунитета можно резюмировать наличие у инфицированных животных состояние стресса и напряжения иммунной системы, о чем свидетельствует увеличение глобулиновой фракции белков сыворотки крови и лейкоцитоз со сдвигом нейтрофильного ядра влево. Подтверждает наше мнение и факт увеличения содержания в крови у животных с ретровирусной инфекцией таких структур, как базофилы, являющихся катализаторами аллергических реакций, и эозинофилов – промоутеров воспалительных процессов.

Дефицит одной или нескольких различных фракций клеток крови свидетельствует об уменьшении протекторных и трофических свойств крови. Развитие компенсаторной гиперхромной анемии у инфицированных ретровирусами животных является маркером возможной гипоксии в тканях организма. В результате недостатка кислорода в тканях, анаэробные процессы начинают преобладать над аэробными. Продуктом анаэробного «дыхания» клеток являются недоокисленные продукты, нарушающие кислотно-щелочной баланс и снижающие буферные свойства крови.

Биохимические изменения, такие как повышение креатинина, активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, повышенное количество билирубина, снижение альбумина характеризуют почечную патологию с деструктивными изменениями в печени. Повышение активности щелочной фосфатазы характеризует нарушение фосфорно-кальциевого обмена, заболеваний печени, сопровождающиеся холестаазом.

Таким образом, изучение коррелятивной связи между гемограммой и биохимическими показателями крови крупного рогатого скота, как маркеров состояния адаптивного иммунитета, позволило выявить степень дегенеративных явлений в организме животных и определить характер

течения инфекции, в том числе на популяционном уровне по группам животных.

2.2.2. Сравнительный анализ результатов АСМ-сканирования агранулоцитов крови интактного и инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота

При различных типах иммунных патологий в первую очередь изменяются структурно-механические свойства мембран лимфоцитов, что является ранним, а иногда и единственным биофизическим признаком их функциональных нарушений [15, 16, 136, 156]. Кроме того, особенности морфологии с оценкой структурно-механических свойств инфицированных ретровирусами клеток представляет интерес с точки зрения прогноза течения заболевания, особенно при диагностике гематопатологий [18].

Решение данной проблемы стало возможным в результате внедрения в медико-биологические исследования методов АСМ-сканирования, которые позволили изучать нативные цитологические структуры с механизмом их функционирования путем многопараметрической оценки физических показателей образцов.

Выделение чистой фракции лимфоцитов для выполнения АСМ сканирования выполнялось по оригинальной авторской методике [89], что позволило избежать возникновения различных артефактов, возникающих при пробоподготовке другими известными способами, в частности: присутствие в мазке других клеток помимо агранулоцитов, разрыхление цитолеммы, деградация клеток, образование вздутий на мембране, наложение клеток друг на друга, кристаллы фикола на сканируемой поверхности и др. (рис. 10).

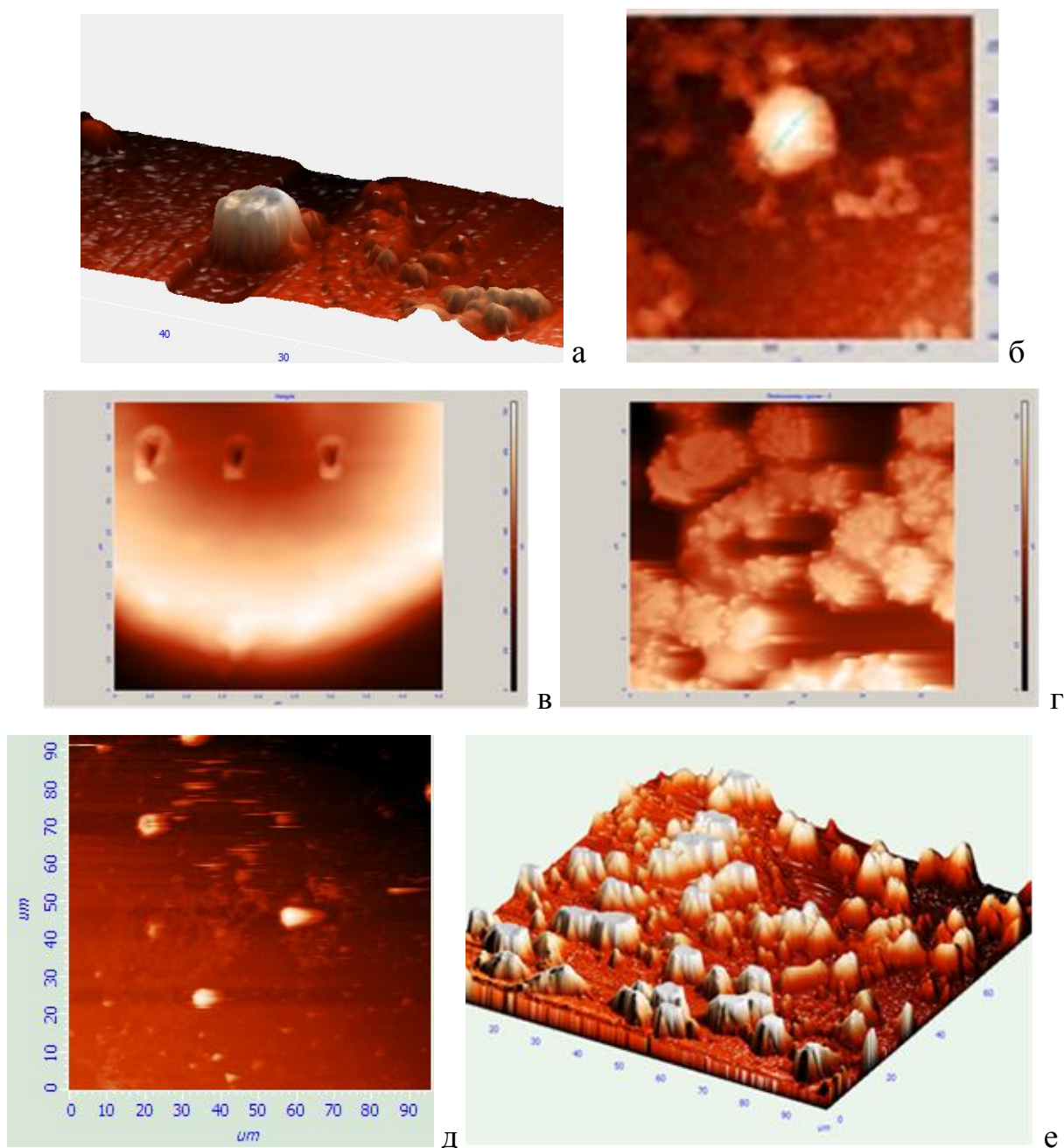


Рисунок 10 – Дефекты АСМ сканирования (а - присутствие в мазке других клеток помимо агранулоцитов, б - деградация клеток, в - разрыхление цитолеммы, г - образование вздутий на мембране, д - кристаллы фикола на сканируемой поверхности, е - наслоение клеток друг на друга)

Исследование морфометрических параметров как интактных, так и пораженных лимфоцитов при *BIV*-, *BLV*- и микст-инфекции проводили на сканирующем атомно-силовом микроскопе фирмы «NT-MDT» модель Solver P47 PRO (Зеленоград, Россия).

Применение инструмента создания 3-D проекции препарата позволило определить наиболее удобные для сканирования участки с отдельно расположенными неповрежденными клетками характерной морфологии (рис. 11).

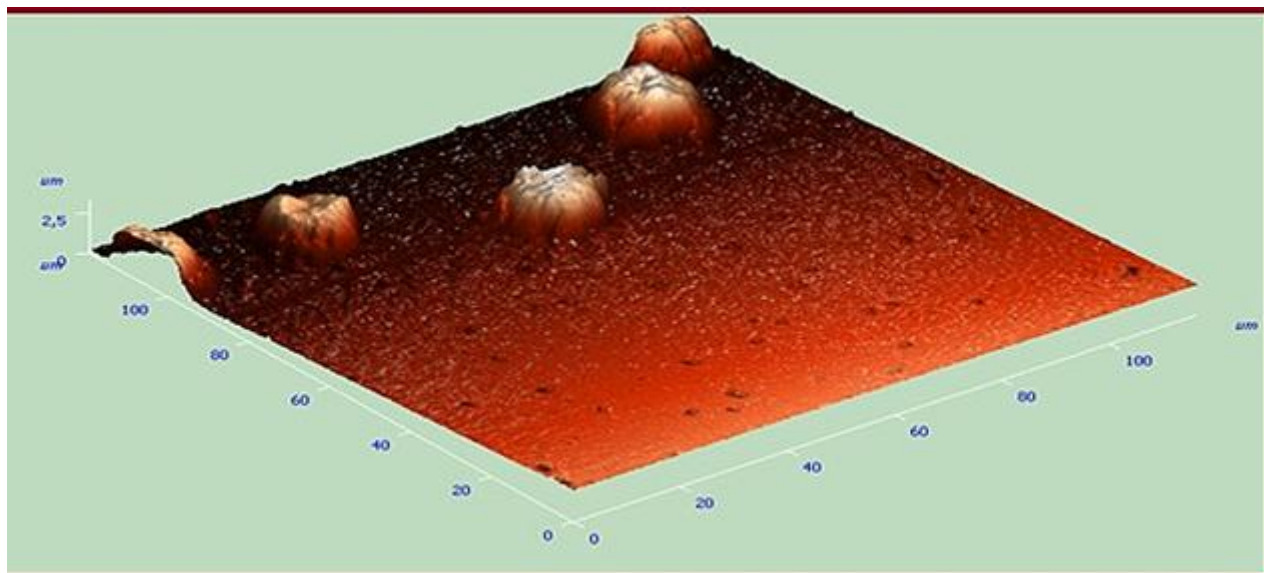
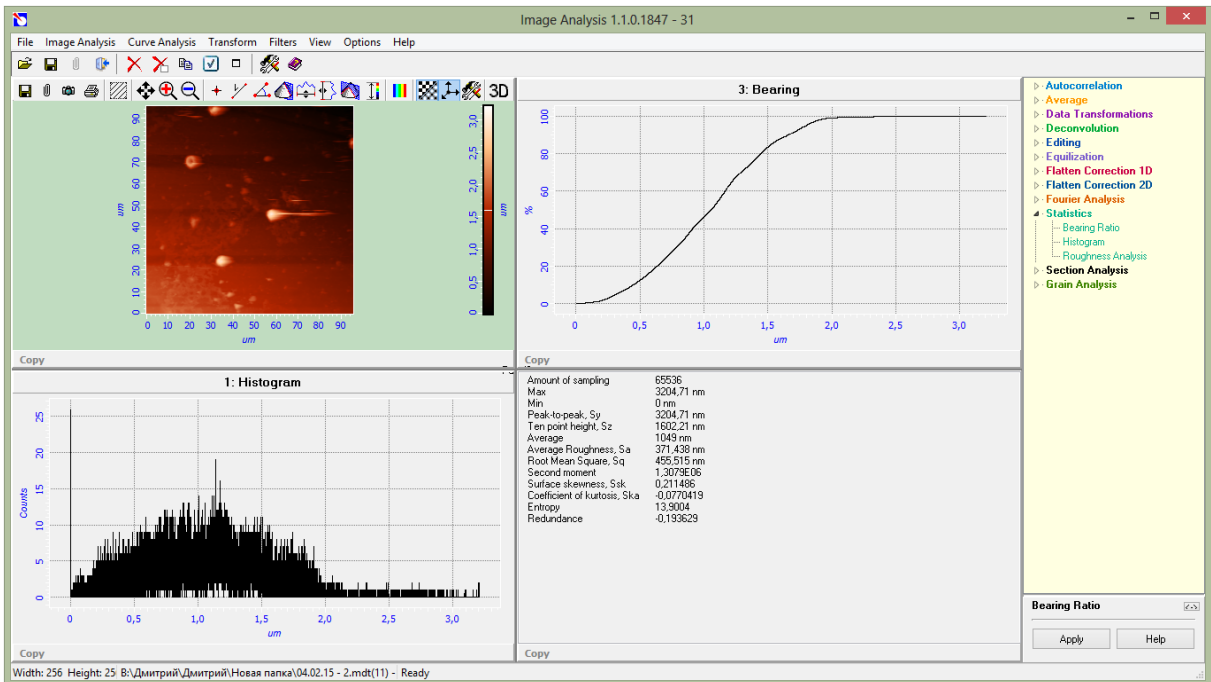


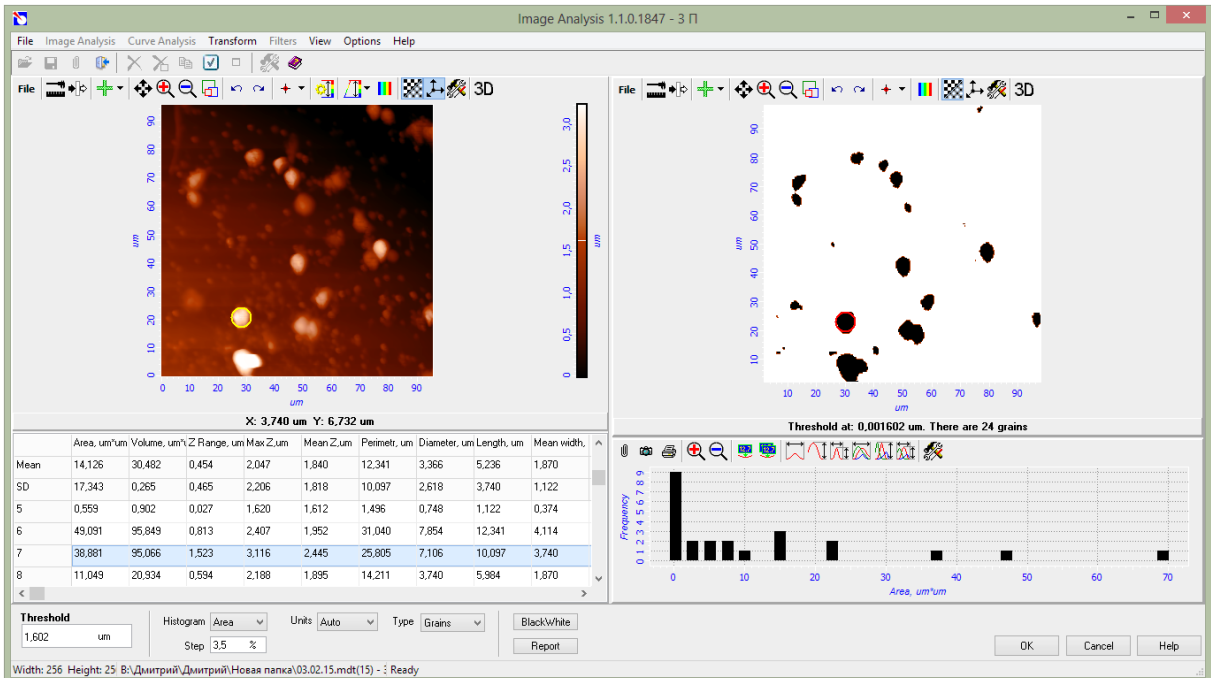
Рисунок 11 – 3-D проекция лимфоцитов при АСМ

Данным методом при применении инструмента «Roughness Analysis» были определены такие морфометрические и биофизических параметры лимфоцитов как: диаметр, высота, площадь и объем клеток, а также адгезивность, шероховатость и модуль упругости клеточных мембран.

Развитие лейкоза может прогрессировать благодаря реализации различных механизмов, что отражается на морфометрических характеристиках злокачественных клеток. В гуманной медицине такими примерами могут служить трансформация или развитие диффузной В-крупноклеточной лимфомы и возникновение лимфомы Ходжкина на фоне хронического лимфоцитарного лейкоза или лимфомы из малых лимфоцитов [163]. Соответственно, морфометрические параметры лимфоцитов являются важными характеристиками при классификации форм гемобластозов (рис. 12).



а



б

Рисунок 12 – Измерение отдельного параметра - высоты (а) и анализ всех морфометрических параметров (б) отдельного лимфоцита

Известно, что инициальная адгезия покоящихся лимфоцитов по большей части связана с процессом гемодинамики. При воспалении и иных патологических состояниях дополнительное увеличение адгезии обусловлено специальными сигнальными молекулами, которые могут обеспечивать специфическое инициальное взаимодействие, поскольку происходит

значительная модификация клеточного адгезивного фенотипа в связи с изменением функции клеток [164]. В этой связи измерение адгезии лимфоцитов важно для комплексной оценки их функционального статуса (рис. 13).

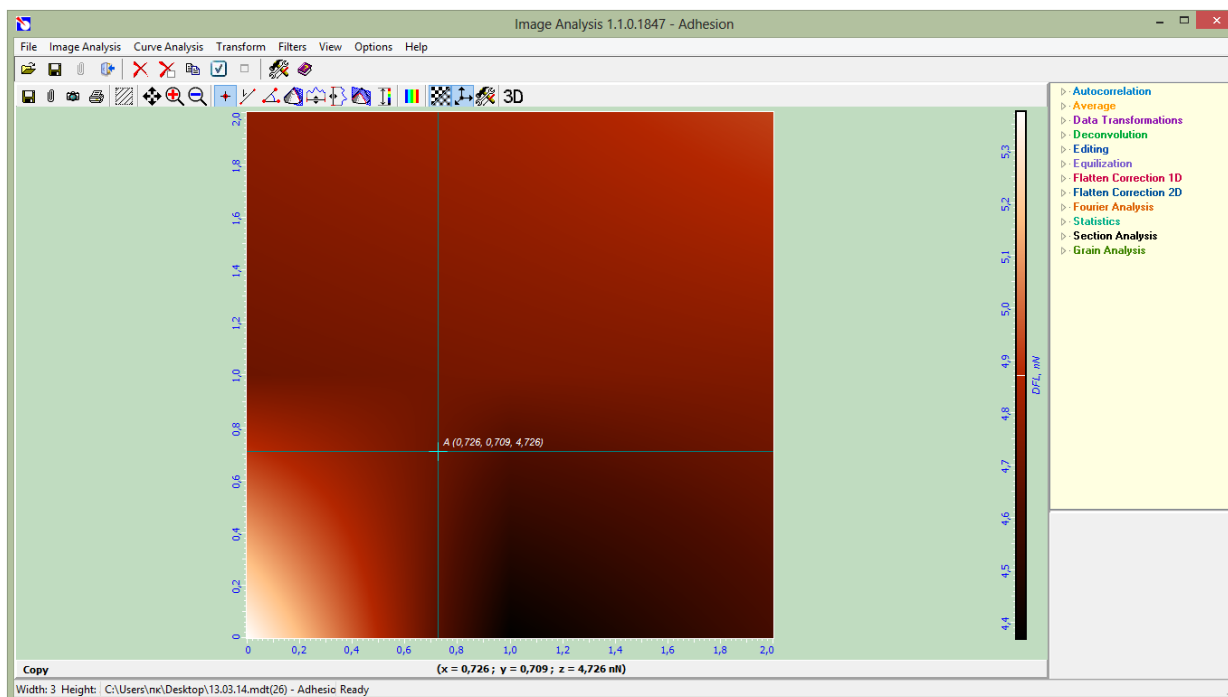


Рисунок 13 – Измерение адгезии лимфоцита

Одним из наиболее показательных биофизических параметров клеток, в том числе лимфоцитов крупного рогатого скота, как интактных, так инфицированных ретровирусными заболеваниями, является определение абсолютной величины модуля Юнга по силовым кривым при применении модели Герца, в которой определяется взаимодействие зонда атомно-силового микроскопа и бесконечной плоскости (поверхность биологического образца) лимфоцитов. Данный параметр определяет с одной стороны способность клеток к деформации, происходящей в результате взаимодействия мембраны с вершиной зонда АСМ, с другой стороны упругость клеточной мембраны, что характеризует также состояние цитоскелета клетки, и чем больше его значение, тем меньше упругая деформация клетки (рис. 14).

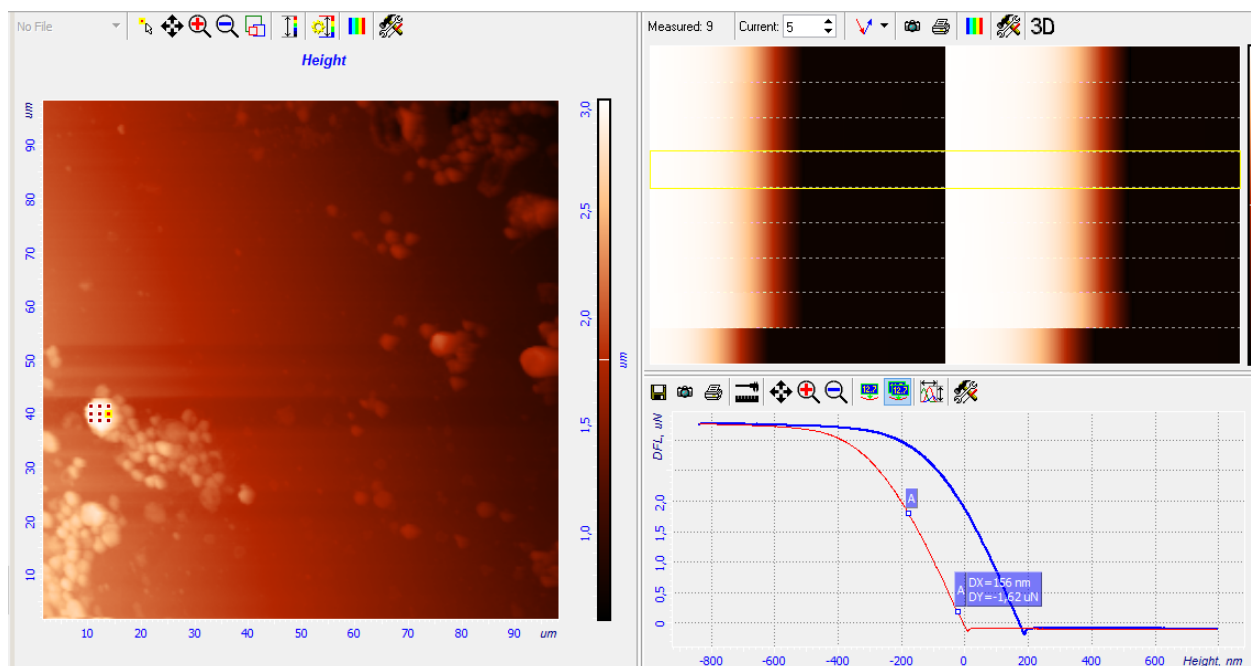


Рисунок 14 – Измерение силовых кривых для расчета модуля Юнга клетки

АСМ - сканирование показало достоверные изменения параметров клеток у интактных и инфицированных ретровирусами животных. Данные значения морфометрических и биофизических параметров приведены в таблице 3. Выявленные тенденции наглядно иллюстрируют рисунки 15 и 16.

Таблица 3 – Структурно-биофизические характеристики агранулоцитов крови крупного рогатого скота с разным гематологическим статусом

Параметр	Интактные лимфоциты	<i>BLV</i> -инфекция	<i>BIV</i> -инфекция	<i>BIV-BLV</i> -инфекция
Диаметр клетки, μm	$8,80 \pm 0,43$	$7,17 \pm 0,56^{* \#}$	$12,83 \pm 1,26^{* \#}$	$6,80 \pm 0,44^{* \#}$
Высота клетки, μm	$14,13 \pm 1,37$	$12,83 \pm 1,31^{* \#}$	$15,89 \pm 1,49^{* \#}$	$10,57 \pm 1,51^{*}$
Площадь клетки, μm^2	$75,81 \pm 3,29$	$55,72 \pm 3,07^{* \#}$	$105,35 \pm 9,18^{* \#}$	$50,71 \pm 3,23^{*}$
Объем клетки, μm^3	$81,91 \pm 8,12$	$78,30 \pm 8,31^{*}$	$111,23 \pm 7,29^{* \#}$	$52,94 \pm 4,01^{* \#}$
Адгезия, pN	$54,36 \pm 3,80$	$123,20 \pm 8,20^{*}$	$184,12 \pm 9,94^{*}$	$162,12 \pm 7,42^{*}$
Модуль Юнга, МПа	$215,10 \pm 10,50$	$142,30 \pm 2,60^{\#}$	$138,10 \pm 9,85^{* \#}$	$143,90 \pm 2,85^{*}$
Шероховатость, nm	$319,22 \pm 11,11$	$438,35 \pm 9,25^{*}$	$380,39 \pm 10,21^{*}$	$366,35 \pm 8,24^{*}$

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп; # - статистически значимые различия опытных групп между собой; ($p < 0,05$).

Как следует из данных таблицы 3, лимфоциты условно здорового крупного рогатого скота имели диаметр 9 мкм, при инфекции *BLV* и при *BIV-BLV*-инфицировании диаметр клеток уменьшался на 18,5% и 22,7%

относительно показателей интактных животных. Высота исследуемых клеток при *BLV*-, и *BIV-BLV* инфекции скота также уменьшалась на 9% и 25%, в сравнении с клетками интактных животных. Данная тенденция характерна для площади и объема клеток, вышеуказанные характеристики уменьшились на 36%; 49,5%; 4,4% и 35%, соответственно. А вот при *BIV*-инфекции данные морфометрические параметры агранулоцитов, напротив, увеличились: на 40% - площадь, 12,7% - высота, 45,8% - диаметр, 35,8% - объем в сравнении с исследуемыми клетками крови условно здоровых животных.

Модуль упругости (Юнга) лимфоцитов при *BIV*-инфекции уменьшался значительно в сравнение с другими экспериментальными группами – на 35,8%, при *BLV*-инфицировании - на 33,8%, а у *BIV-BLV*-инфицированных животных - на 33,1%. При этом, такой параметр как шероховатость при *BLV*, *BIV* и микст-инфекции возрастал на 37,3%, 19,2% и 14,8%, соответственно, при сравнении с шероховатостью интактных клеток. Их адгезивные характеристики также повышались в 2,3, 3,4 и 3,0 раза соответственно, в сравнении с лимфоцитами условно здорового крупного рогатого скота.

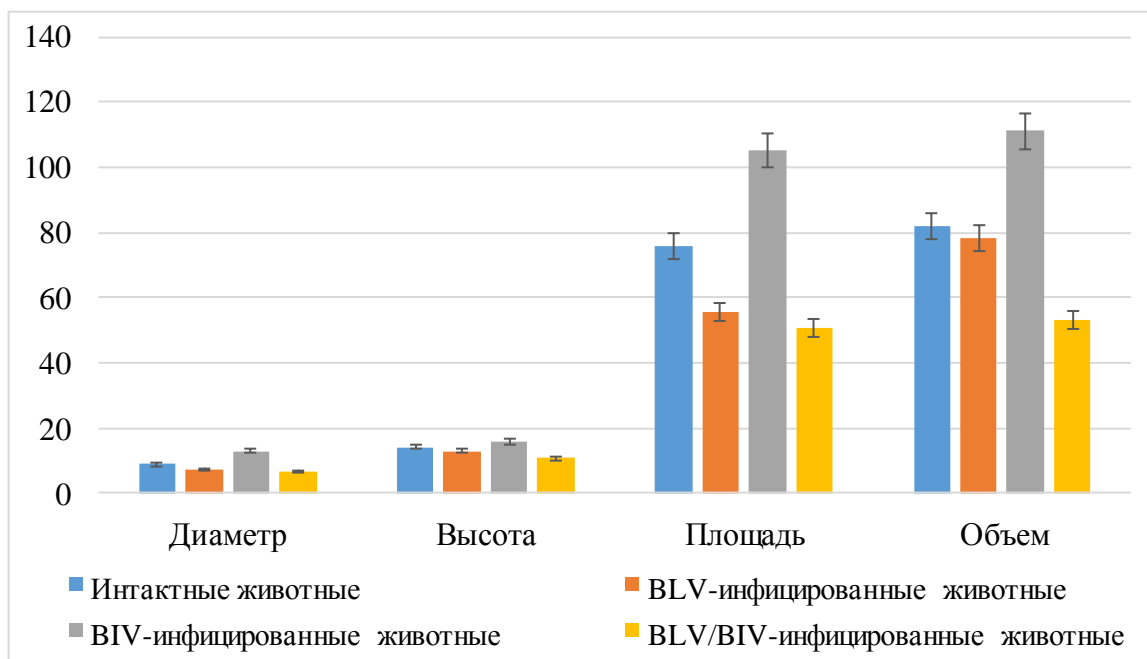


Рисунок 15 – Морфометрические параметры лимфоцитов (диаметр и высота – μm , площадь – μm^2 , объем – μm^3)

Как представлено на рисунке 7, морфометрические характеристики лимфоцитов крови исследуемых животных при *BLV* и *BIV-BLV*-инфекции значительно снизились, что характеризуется развитием дегенеративных процессов в них. Особенно выражено это для микст-инфицированных клеток. Аналогичные тенденции выявляются при *HTLV-I* обусловленной патологии у людей. Следует отметить, что филогенетический анализ показал высокую степень гомологии *HTLV-I* и *BLV*. Морфометрия лимфоцитов при *BIV*-инфекции, напротив, сопровождается увеличением морфометрических характеристик клеток, что характеризует незрелость клеток.

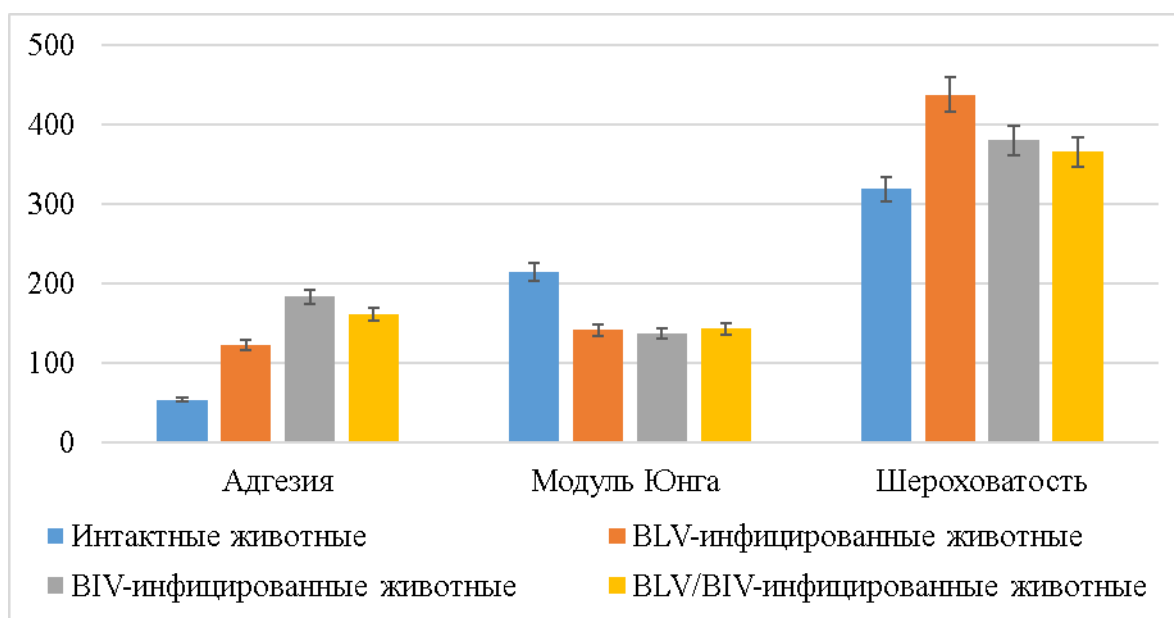


Рисунок 16 - Биофизические параметры лимфоцитов
(адгезия – nN, модуль Юнга – Мпа, шероховатость – nm)

Модуль упругости лимфоцитов крупного рогатого скота при *BIV*-инфекции значительно понижается в сравнение с другими экспериментальными группами – на 35,8%, у *BLV*-инфицированных на 33,8%, а *BIV-BLV* – зараженных животных - на 33,1%, что характеризует повышение жесткости цитолеммы, возможно, из-за повышения тургора клетки или изменений в структуре ее цитоскелета. Увеличение шероховатости, вероятно, обусловлено изменением антигенной структуры инфицированных клеток в результате слияния, возможно многократного, их

оболочки с наружной липопротеиновой оболочкой вирусов. Увеличение показателя адгезии ретровирус-инфицированных лимфоцитов является следствием стимуляции их сигнальными молекулами и может приводить к увеличению агрегации клеток и росту неспецифической паталогической иммунной реактивности, о чем свидетельствует развитие базофилии у животных эмпирических групп.

Определенные, при атомно-силовом сканировании, морфометрические и биофизические характеристики лимфоцитов крови крупного рогатого скота с *BLV* и *BIV* инфекцией имеют существенное теоретико-фундаментальное, а также прикладное значение.

Полученные нами результаты частично аргументируют этиологию «стойкой живучести» инфицированных ретровирусами лимфоцитов. Согласно литературным данным, перезаражение крупного рогатого скота при гемобластозах чаще всего происходит ятрогенным путем или по средствам гематофагов, то есть инфицированными лимфоцитами, но не вирусом. Увеличение жесткости клеточной мембраны лимфоцита содействует повышению резистентности инфицированной клетки к воздействию на нее физико-химических факторов внутренней среды зараженного организма.

Во-вторых, увеличение шероховатости цитолеммы лимфоцитов, обусловленное формированием псевдоподий, может приводить к агрегации клеток с повышенными адгезивными свойствами и усиленным антигенным профилем следствием чего является развитие аутоиммунных реакций у инфицированных животных.

Полученные нами результаты коррелирую с данными ряда исследователей. Структурными единицами межклеточной адгезии являются ассоциированные с цитоплазматической мембраной белковые структуры, обуславливающие механические взаимосвязи клеток между собой. При этом, любая молекула межклеточной адгезии взаимодействует с несколькими лигандами, используя разные участки связывания. То есть молекулы адгезии, расположенные кластерами на поверхности клеток, образуют участки

множественного связывания. Увеличение адгезивности играет решающую роль в механизме зарождения и развития атеросклероза, а также при дисфункции эндотелия, воспалительных и других патологических явлениях.

При опухолевых заболеваниях отмечается прямая корреляция между степенью экспрессии некоторых молекул клеточной адгезии и гистологически установленной степенью злокачественности онкопатологии. Так, концентрация sICAM-1 (структурная единицы клеточной адгезии, имеющаяся в незначительном количестве в составе цитолеммы лимфоцитов, эндотелиальных клеток) в сыворотке периферической крови людей при опухолевом процессе желудочно-кишечного тракта и метастазировании в печень значительно превышает данный показатель, чем у пациентов без метастазирования. В связи с лимфопролиферативными патологиями экспрессия поверхностных антигенов определена степенью злокачественного перерождения. Статистика показывает, что концентрация sICAM-1 увеличивается, при *HTLV-I*-ассоциированной миелопатии и Т-клеточной лейкемии, также характерным является повышение уровня sICAM-1 у лиц с ВИЧ-1 [162]

2.2.3. Компаративная оценка функциональных показателей лимфоцитов при *BLV* и *BIV*-инфекции с применением фотометрических методов

Изучение метаболической активности интактных и инфицированных лимфоцитов крови с помощью МТТ – теста

Метаболическое перепрограммирование при канцерогенезе является патогенетической особенностью развития новообразований, усугубляющей выраженность всех признаков, присущих опухолевым клеткам. Нарушение энергетического и углеводного обменов, проявляются изменением интенсивности анаэробного гликолиза и тканевого дыхания [50, 51, 58, 61].

Не так давно было установлено, что опухолевые клетки получают необходимую энергию в результате анаэробного гликолиза, употребляя меньше кислорода, чем нормальные ткани. В этих клеточных структурах

постоянно обнаруживается усиление анаэробного гликолиза. Компенсаторная реакция, возникшая в ответ на дефицит АТФ, при недостатке кислорода, усиливает данный процесс в гиалоплазме опухолевых клеток, сопровождающаяся ослаблением тканевого дыхания [31]. В последнее время исследования морфофункционального состояния клеток периферической крови, в частности лейкоцитов, проводятся при различных инфекционных заболеваниях [23, 68, 69, 107].

Изучение дыхательной активности агранулоцитов крови, при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота является актуальной задачей современной ветеринарной вирусологии, так как поможет обосновать метаболические изменения на уровне клетки и гомеостаза организма в целом, и выработать подходы к разработке эффективных методов специфической профилактики инфекции. В клинко-диагностической практике исследование окислительно-восстановительной активности основывается на вариациях фиксирования и учета теста с нитросиним тетразолием (НСТ-тест, МТТ-тест). Тест основан на том, что НАДФ-Н зависимые клеточные оксидоредуктазные ферменты, содержащиеся в агранулоцитах (лимфоциты) восстанавливают тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (РЕАРУС) в нерастворимый формазан, имеющий пурпурное окрашивание (рис. 17).

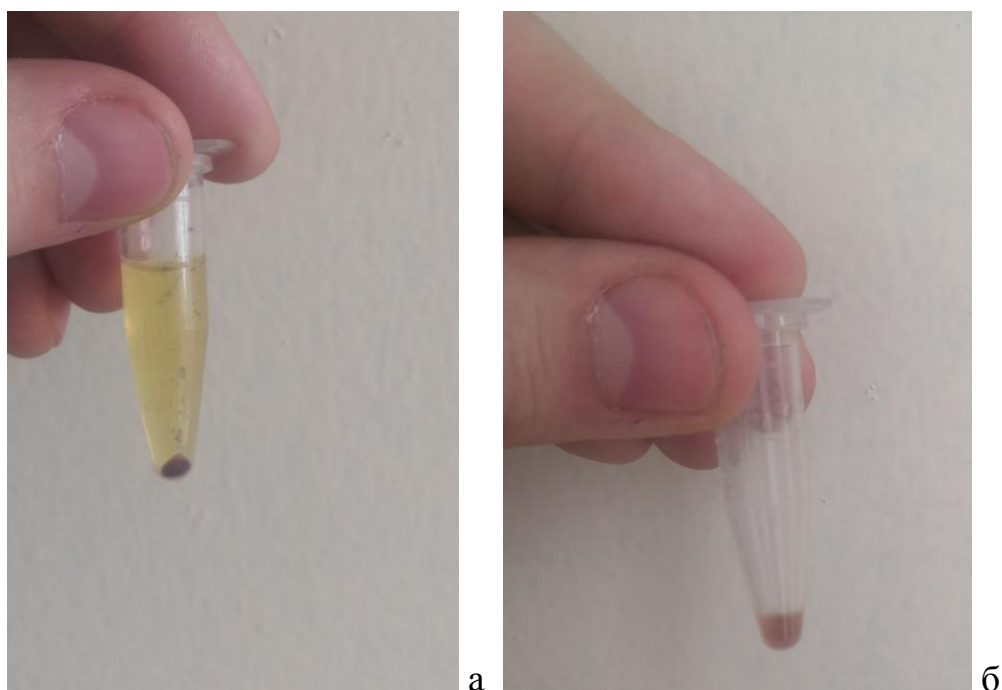


Рисунок 17 - Образование осадка формазана (а), растворение его в DMSO (б)

Сравнительную оценку функционально-метаболической активности лимфоцитов периферической крови интактного и инфицированного вирусами лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота по сравнению с лимфоцитами интактных животных осуществляли с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия (МТТ-тест) с последующей спектрофотометрией (таб. 4).

Таблица 4 – Содержание формазана в интактных и инфицированных ретровирусами лимфоцитах по результатам МТТ-теста

Показатель	Интактные лимфоциты	<i>BLV</i> -инфекция	<i>BIV</i> -инфекция	<i>BIV-BLV</i> -инфекция
нг формазана/лимфоцит	2,45 ± 0,77	1,74 ± 0,78*#	0,64 ± 0,28*#	0,33 ± 0,11*#

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп; # - статистически значимые различия опытных групп между собой; ($p < 0,05$).

Результаты, МТТ-теста показали достоверное изменение продукции кислородных метаболитов у животных-вирусоносителей, в сравнении с интактными, что свидетельствует о нарушении тканевого дыхания и переходе метаболизма клеток на анаэробный гликолиз (рис 18).

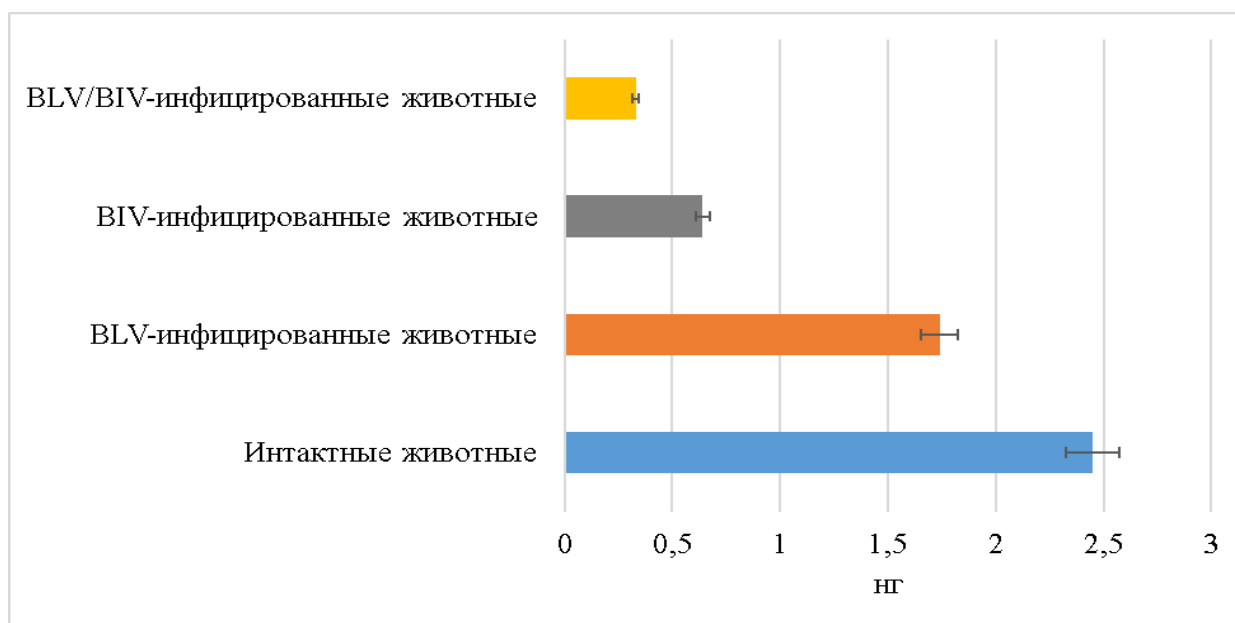


Рисунок 18 – Метаболическая активность интактных и инфицированных лимфоцитов с помощью МТТ – теста, нг формазана/лимфоцит ($P = 0,027$)

Результаты наших исследований, представленные в таблице 4 и отраженные на рисунке 17, свидетельствуют об изменении уровня функциональной генерации кислородных радикалов в лимфоцитах инфицированных и интактных коров. По результатам МТТ-теста, у носителей *BLV*, *BIV* и микст-инфицированных животных количество восстановленного тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида, достоверно уменьшается до $1,74 \pm 0,78$; $0,64 \pm 0,28$; $0,33 \pm 0,11$ нг в пересчете на один лимфоцит, против $2,45 \pm 0,77$ нг/лимфоцит в группе не реагирующих в ПЦР животных. То есть функциональная активность лимфоцитов крови *BLV*-, *BIV*-, *BLV/BIV*-инфицированных коров была в 1,4; 3,8; 7,4 раза меньше, чем у интактных.

Результаты наших исследований, отраженные на рисунке 17, свидетельствуют об изменении уровня функциональной генерации кислородных радикалов в лимфоцитах инфицированных и интактных коров. Такие изменения, указывают на то, что лимфоциты носителей ретровирусных инфекций, не в состоянии метаболизировать свой эффекторный потенциал активных форм кислорода, что свидетельствует о переходе на менее энергетически емкий путь гликолиза (анаэробный), особенно при сочетанной

патологии. Усиление анаэробного гликолиза (путь Эмбдена-Мейергофа) в гиалоплазме клеток, при *BLV*, *BIV*, *BLV/BIV* – инфекции сопровождается ослаблением тканевого дыхания, которое происходит в митохондриях.

Оценка функционального статуса агранулоцитов BLV, BIV и BLV/BIV - инфицированных и интактных животных с помощью микроспектрального анализа.

Стратегия ретровирусов в зараженной клетке в настоящее время является объектом пристального внимания исследователей во всем мире. Одни вирусные белки демонстрируют диффузное цитоплазматическое распределение, другие - локализуются в ядрышках [150]. Вопрос перераспределения продуктов биосинтеза в инфицированных ретровирусами клетках является актуальным научным аспектом ветеринарной и гуманной медицины, он важен для развития современных подходов к диагностике, дифференциальной диагностике и составления прогнозов при гематопатологических процессах.

Перспективным для решения данной задачи является люминесцентно-микроскопический метод исследования. Данный метод основан на поглощении монохроматического излучения, т.е. излучения с одной длиной волны в видимых и ультрафиолетовых областях спектра. В частности, с помощью данного метода исследования установлена закономерность конформационных изменений в структуре гемоглобина при лейкозе крупного рогатого скота [71]. Способность регистрировать, с помощью данного метода, ранние биохимические и морфофункциональные сдвиги (фотохимические изменения), развивающиеся в клеточных структурах до возникновения клинической и патоморфологической картины, определенно является приоритетом для дифференциальной диагностики заболеваний на ранних этапах их развития.

Спектральный анализ выделенных агранулоцитов проводили с помощью универсального цветового анализатора микроскопа-

спектрофотометра ЛОМО МСФУ-К (Россия). Измерения проводились с помощью стандартного монохроматора MSFU-K мощностью 800А с шагом измерения 0,5 Нм и диаметром точки сканирования 10-4 мм при увеличении 480х (12х40). Интенсивность поглощения света ($I(\lambda)$) регистрировалась в диапазоне спектра 300 - 700 Нм. Согласно полученным данным, степень поглощения окрашенных набором Лейкодиф 200 лимфоцитов определялась в спектре Эозина U и Лазури II (рис.19).

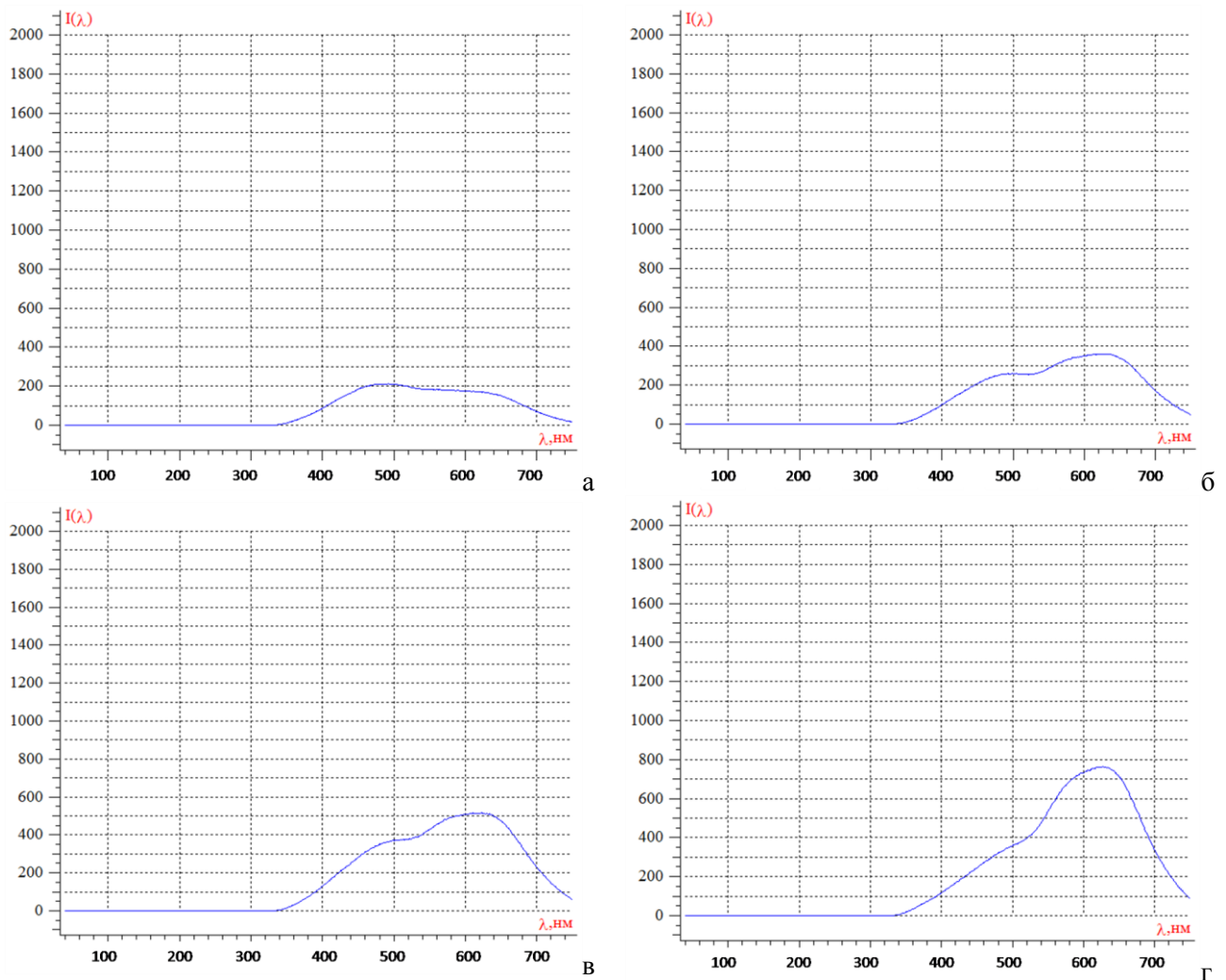


Рисунок 19 - Зависимость интенсивности поглощения окрашенных лимфоцитов от длины волны (а - интактные; б - *BLV*-инфицированные; в - *BIV*-инфицированные; микст-инфицированные)

Данные сравнительной оценки морфофункционального состояния агранулоцитов *BLV*, *BIV* и *BLV/BIV*- инфицированных и интактных животных с помощью микроспектрального анализа представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Показатели поглощения лимфоцитов интактного и инфицированного крупного рогатого скота в зависимости от длины волны

λ , нм	Интактные лимфоциты	<i>BLV</i> -инфекция	<i>BIV</i> -инфекция	<i>BIV-BLV</i> -инфекция
350	31,3±1,5	50,1±2,6*#	35,5±1,7	33,3±1,6
400	97,5±4,9	110,3±5,6	110,7±5,5	73,3±3,7*#
450	195,4±9,8	310,4±15,5*#	286,9±14,3*#	115,2±5,8*#
500	210,3±10,5	371,5±18,5*	351,2±17,2*	253,3±12,7*#
550	98,7±4,9	146,6±7,3*	175,5±8,8*#	150,7±7,5*
600	93,5±4,6	189,1±9,5*	188,3±9,4*	148,3±4,7*#
650	173,6±8,6	500,2±24,9*#	751,4±37,6*#	383,3±19,2*#
700	156,2±7,8	461,6±23,1*#	725,2±36,3*#	345,4±17,3*#
750	34,4±1,7	50,3±2,6*	99,6±4,9*#	51,1±2,6*

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп; # - статистически значимые различия опытных групп между собой; ($p < 0,05$).

Из данных, представленных в таблице 5, при исследовании спектров поглощения окрашенных агранулоцитов крови коров с ретровирусной моно- и микст-инфекцией в сравнении с таковыми у интактных животных, были зарегистрированы достоверные отличия в полученных показателях. Для лимфоцитов коров с сочетанной патологией (*BLV/BIV*) значения поглощения (I_{λ}) в спектре эозина У и азура II составили 351,2±17,6 и 751,4±37,6 counts соответственно. Для животных с *BLV* и *BIV* моно-инфекцией эти показатели составили 253,3±12,7; 383,3±19,2 и 371,5±18,5; 500,2±24,9 counts соответственно. В то время как у интактных коров данные показатели регистрировались на уровне 210,3±10,5 и 173,6±8,6 counts. Исходя из того, что интенсивность поглощения светового пучка определенной длины волны окрашенными клетками тем выше, чем больше концентрация вещества в клетке, окрашенного красителем, диапазон поглощения которого находится в известных пределах, используя полученные данные возможно рассчитать соотношение основных и кислых компонентов в клетке.

Ядерно-цитоплазматическое отношение является важной морфологической характеристикой, позволяющей определить уровень метаболизма и произвести оценку компенсаторных процессов в клетке. Мононуклеары крови характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим

соотношением. Однако этот показатель не тождественен соотношению базофильных и оксифильных клеточных компонентов, который на наш взгляд является более информативным, так как отражает не столько структурные особенности, сколько функциональное состояние клетки.

По нашим данным у интактных животных соотношение кислотных и основных компонентов в клетке было равномерно пропорциональным, то есть коэффициент соотношения составил $0,83 \pm 0,04$. Для *BIV*, *BLV* и *BLV/BIV*-инфицированных животных этот коэффициент в среднем составил; $1,34 \pm 0,06$, $1,51 \pm 0,08$ и $2,13 \pm 0,11$, то есть оказался в 1,6; 1,8 и 2,6 раз выше, чем у интактных. Однако утверждать, что в клетке резко увеличилось содержание нуклеиновых кислот мы не можем, так как азур II окрашивает все базофильные структуры, включая аморфный компонент межклеточного вещества. Кроме того, АСМ-сканирование лимфоцитов крупного рогатого скота с ретровирусной инфекцией не выявило столь значительных морфотопографических изменений по сравнению с интактными животными [108].

То есть, можно предположить, что в данном случае в клетке развивается метаболический ацидоз. При этом рН может быть приближен к нормальным показателям и метаболическая активность клеток не снижается. Более того, повышенная метаболическая активность клеток, сама по себе, является причиной развития ацидоза. В данном случае, в равной степени, это может быть обусловлено продукцией вирусных частиц и поликлональной пролиферацией лимфоцитов. Причиной метаболического ацидоза служит накопление кетоновых тел и других недоокисленных промежуточных метаболитов. Вероятно, что предрасполагающим фактором является токсичное действие вирусных белков в инфицированных лимфоцитах. Полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют прямую корреляцию с результатами выполненных нами гематологических исследований и свидетельствуют об изменении гомеостаза организма инфицированных животных, в том числе и на уровне клетки.

2.2.4. Разработка способа получения лимфоцитов крупного рогатого скота

Результаты исследований в большой степени зависят от способа пробоподготовки. Это касается и клеток крови. Для АСМ сканирования, МТТ- теста и микроспектрального анализа нам было необходимо получить фракцию неповрежденных лимфоцитов, максимально освобожденную от примеси других клеточных элементов, отмытую от фикола и сывороточных белков.

Кровь крупного рогатого скота обладает рядом принципиальных в нашем случае особенностей:

- преобладанием лимфоцитов над гранулоцитами – до 75%, в то время как у собак и лошадей этот показатель составляет не более 40% и 44%, у кошки, овцы и свиньи – не более 50%;

- очень низкой скоростью оседания эритроцитов, так у лошади этот показатель составляет в среднем 64 мм/ч, у свиньи – 30 мм/ч, у собаки 2,5 мм/ч, а у КРС – 0,58 мм/ч;

- относительно большим содержанием тромбоцитов – до 700 тыс./мкл, в то время как у лошадей, овец и собак их не более 500 тыс./мкл, а у свиней – не более 300 тыс./мкл.

Существующие способы выделения, очистки и контроля чистоты фракции лимфоцитов не смогли обеспечить нам необходимого результата. В частности, во взвеси обнаруживали примесь эритроцитов и тромбоцитов, происходил гемолиз, не удавалось полностью избавиться от фикола, часть клеток деградировала в процессе пробоподготовки.

Наше изобретение касается биотехнологии, генной инженерии, ветеринарной медицины и характеризует фракционирование жизнеспособных клеток (лимфоцитов) из периферической крови крупного рогатого скота.

Разработка способа осуществлялась в несколько этапов. *На первом этапе* в результате патентного поиска были определены наиболее близкие по

сути к нашему изобретению аналоги, были отмечены их достоинства и выявлены моменты, требующие доработки для реализации нашей задачи.

1. Способ получения лимфоцитов из тонкого кишечника мыши, патент RU 2514653 C1, (51) МПК C12N 5/0781 (2010.01), C12N 5/0783 (2010.01), опубликованный 27.04.2014 г., заключающийся в изъятии и очистке участка кишечника от пейеровых бляшек, с последующим измельчением в присутствии фосфатно-солевого раствора с дитиотреитолом; после этого суспензия пропускается через нейлоновую сетку и инкубируется в буферном растворе, содержащем бычий сывороточный альбумин; далее удаляется надосадочная жидкость и взвесь снова инкубируется в клеточной среде RPMI-1640 уже содержащий эмбриональную телячью сыворотку, NEPES и коллагеназу с последующей фильтрацией и центрифугированием полученной суспензии и определением выхода жизнеспособных клеток с помощью камеры Горяева.

Однако есть ряд недостатков, не позволяющих применять этот способ:

- используется большое количество химических реагентов и дорогостоящих компонентов для выделения, такие как: бычий сывороточный альбумин, эмбриональная телячья сыворотка, коллагеназа, среда RPMI-1640, камера Горяева, нейлоновая сетка;

- данный способ предполагает эвтаназию животных с извлечением отдела кишечника, чистку кишечника от инородных и каловых масс, обрезку лимфоидных бляшек, проведение продольного и поперечного размельчение кишечника, размягчение данных тканей с помощью ферментативной обработки (применение различных типов коллагеназы).

2. Среда для выращивания культуры аутологичных лимфоцитов, патент RU 2 393 218 C1, (51) МПК C12N 5/0781 (2010.01), опубликованный 27. июня 2010 года, производимый с использованием среды RPMI - 1640 (Roswell Park Memorial Institute) в котором имеется 10% раствор фитогемоагглютинаина, а также сыворотка собственной крови пациента.

Однако есть ряд недостатков, не позволяющих применять этот способ в ветеринарной медицине:

- нет выхода чистой взвеси лимфоцитов для исследования;
- для реализации данного метода необходимо достаточно много времени (минимум 72 часа);
- используется достаточно дорогостоящие химические реактивы для выращивания культуры, такие как: фитогемоагглютинин.

3. Способ выделения мононуклеаров из крови человек, патент РФ 2061958, МПК G01N33/53, МПК G01N33/483, опубликованный 10 июня 1996 года, заключается в том что, на 3 мл смеси (в которой одна часть 76%-ного верографина и четыре части 3,75%-ного поливинилпиролидона) наносят 6 мл, стабилизированной антикоагулянтом, периферической крови, после производится центрифугирование (400g) на протяжении 30 минут; сразу после центрифугирования выделяют пастеровской пипеткой фракцию мононуклеаров, выглядящее как плотное облако над смесью. Выделенную фракцию клеток промывают однократно в 4-х кратном избытке питательной среды, после, данные мононуклеары необходимо сконцентрировать с помощью центрифугирования (400 g) на протяжении 10 мин.

Недостатками данного способа является то, что поливинилпиролидон относительно дорогостоящий препарат.

На *втором этапе* разработки, нами были определены техническая задача и технический результат, которого мы должны достичь путем ее решения.

Технической задачей, возникшей перед нами, стало создание способа выделения жизнеспособных клеток агрунолоцитов (лимфоцитов) крупного рогатого скота. Технический результат заключался в выделении жизнеспособных лимфоцитов, обладающим большим выходом мононуклеаров. Это необходимо для проведения иммунологических, морфофункциональных и биофизических исследований агрунолоцитов

(лимфоцитов) крупного рогатого скота при различных инфекционных заболеваниях, и в частности, при *BLV* и *BIV*-инфекции крупного рогатого скота.

На третьем этапе мы осуществили апробацию нашей разработки для решения конкретных практических задач.

Пример 1. Выполнение МТТ - теста с выделенными лимфоцитами, с последующей спектрофотометрией.

Диагноз «*BLV* и/или *BIV* инфекция» основывался на данных госветслужбы и лабораторных исследованиях с использованием ПЦР набора «ЛЕЙКОЗ» и собственных разработок (патент РФ на изобретение №2615465 от 04.04.2017 г.) на оборудовании BioRad (USA). Исследование общего анализа крови было произведено с применением гематологического анализатора MicroCC20Vet Auto Hematology Analyzer (HTI, USA).

Исследование окислительно-восстановительной активности агрунолоцитов оценивали в МТТ - тесте спектрофотометрическим способом по методу М.А. Годкова и В.Ю. Зинкина.

МТТ – тест выполняли в соответствии с ниже представленной схемой:

1. Приготовление рабочего раствора тетразолиевого синего бромиды, с помощью разбавления фосфатно-солевым буфером (PBS) из расчета 3 мг/мл (рис 19).

2. Выделение и подсчет количества лимфоцитов в каждой пробе проводили на гематологическом анализаторе. Приготовление раствора для выделения лимфоцитов из цельной крови (данный градиент PBS - Верографин с плотностью 1,078 г/см³). Наслоением 3 мл периферической крови на градиент, в соотношении 1:1 (рис. 20 а).

3. Центрифугирование при 3000 об./мин в течение 30 мин для разделения фракций форменных элементов в градиенте плотности (рис. 20 б).

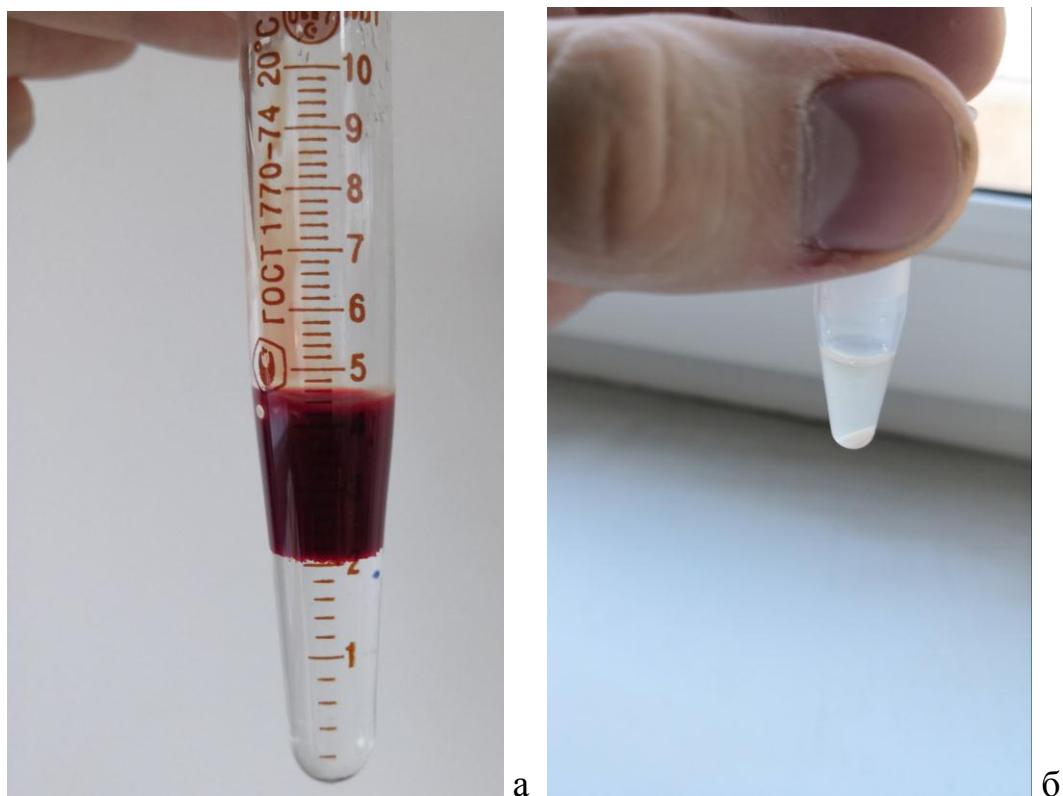


Рисунок 20 - Наслоение крови на градиент (а), взвесь лимфоцитов (б)

4. Сбор лимфоцитов из образовавшегося между плазмой и градиентом плотности кольца в отдельную пробирку. На гематологическом анализаторе MicroCC20Vet Auto Hematology Analyzer определяли концентрацию выделенных агрунолоцитов (лимфоцитов) крупного рогатого скота во всех группах, в среднем - $3,9 \pm 0,28 \times 10^9/L$, что составляет 75-90% от общего количества лимфоцитов полученного образца периферической крови.

5. Добавление в каждую пробу со взвесью *BLV*, *BIV* и *BLV/BIV* - инфицированных и интактных лимфоцитов, по 1 мл нитросинего тетразолия, с последующим шейкированием в течение 1 часа при температуре 37 °C на Environmental Shaker-Incubator ES – 20 (BioSan, UK).

6. Центрифугирование при 1500 об/мин. в течении 5 минут с последующим удалением надосадочной жидкости.

7. Добавление по 1 мл биполярного апротонного растворителя диметилсульфоксида (DMSO, РЕАХИМ) в каждую пробу. Под действием

дегидрогеназ в цитозоле клетки, нерастворимый пурпурный формазан преобразуется в цветной раствор.

8. Экспозиция в течении 30 мин. с шейкированием, для препятствования спаривания и предотвращения повреждения клеток.

9. Измерение оптической плотности раствора на однолучевом сканирующим спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, USA) по разнице экстинкций при длине волны 550 нм.

10. Построение калибровочного графика для определения концентрации восстановленного фомазана в мкг/мл раствора. Зная количество клеток (лимфоцитов) в данном объеме раствора, проводили пересчет на одну живую клетку (нг/лимфоцит).

По результатам МТТ-теста, у носителей ВЛКРС, ВИКРС и с сочетанной патологией, количество восстановленного тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид, достоверно уменьшается до $1,74 \pm 0,78$; $0,64 \pm 0,28$; $0,33 \pm 0,11$ нг в пересчете на один лимфоцит, против $2,45 \pm 0,77$ нг/лимфоцит в группе не реагирующих в ПЦР животных. То есть функциональная активность лимфоцитов крови *BLV*-, *BIV*-, *BLV/BIV*- инфицированных коров была в 1,4; 3,8; 7,4 раза меньше, чем у клинически здоровых животных.

Вышеприведенные исследования доказывают, что полученные, данным способом, лимфоциты являются жизнеспособными.

Таким образом, техническая задача решается, а технический результат достигается приготовлением градиента PBS (фосфатно-солевой буфер) - Верографин с плотностью $1,078 \text{ г/см}^3$. Для этого 10 мл 76% раствора верографина перемешать с 43,1 мл дистиллированной воды и прибавить 0,45 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с доведением плотности до $1,078 \text{ г/см}^3$. Нанесение 2-3 мл раствора PBS-Верографин с последующим наслоением 2-3 мл периферической крови, в соотношении 1:1. Центрифугирование при 3000 об./мин в течение 30 мин для разделения фракций форменных элементов в градиенте плотности.

При этом плавучая плотность мононуклеаров, в том числе лимфоцитов меньше (моноциты – 1,062 и лимфоциты – 1,079 г/см³), чем данный параметр применяемого градиента, в связи с этим данные клеточные популяции располагаются над градиентом. Популяция эритроцитов и гранулоцитов, которые имеют плавучую плотность – 1,1 и 1,082 г/см³ соответственно, в процессе центрифугирования проходят сквозь градиентный раствор и осаждаются на дне центрифужной пробирки. Слой плазмы и тромбоциты, обладающие плотностью 1,026 и 1,058 г/см³ соответственно, располагаются над кольцом мононуклеаров.

При центрифугировании периферической крови происходит разделение на 4 отдельные фракции: первая фракционная группа, располагающаяся на самом дне пробирки, включает эритроциты с обломками клеток крови. Вторая фракционная группа представлена раствором PBS-Верографин. Третья фракционная группа, находящаяся над градиентом, характеризуется суспензией лимфоидных клеток. Четвертая фракционная группа представлена плазмой с тромбоцитами. Пласт лимфоцитов аккуратно снимается по всей площади среза пробирки и транспортируется в чистую, сухую пробирку для центрифугирования. При помощи гематологического анализатора MicroCC20Vet Auto Hematology Analyzer определена концентрация выделяемых агрунолоцитов (лимфоцитов) крупного рогатого скота, что составляет 75-90 % от общего количества лимфоцитов полученного образца периферической крови.

Необходимые реагенты, материалы и оборудование: Раствор PBS-Верографин с удельной плотностью $\rho = 1,078$ г/см³; стерильные стеклянные пробирки (емкость 5–10 мл); центрифуга лабораторная; центрифужные пробирки.

Предлагаемый способ получения лимфоцитов соответствует критериям изобретения "Новизна", "Изобретательский". Данный способ может с успехом использоваться в ветеринарной медицине. Большими преимуществами данного способа являются:

- его доступность, так как он позволяет избежать использования таких дорогостоящих и трудно доступных ингредиентов, как фиколл;
- быстрота воспроизведения, так как отсутствует необходимость дополнительной отмывки клеток;
- высокий выход жизнеспособных агранулоцитов, так как сведены к минимуму такие манипуляции с ними, как встряхивание и центрифугирование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС), с момента выделения заболевания в самостоятельную нозологическую единицу, является одной из первостепенных для сельского хозяйства. Выявление еще одного ретровирусного заболевания - вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота (ИД КРС), стало важным открытием в области ветеринарной нозологии. По мнению ряда отечественных и зарубежных исследователей, ввиду тесного филогенетического родства ретровирусов крупного рогатого скота между собой и с возбудителями Т-клеточного лейкоза и вирусного иммунодефицита человека, проблема имеет общебиологическое и медицинское значение. Так, по данным G. C. Buehring et al. (2019) ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (*BLV*) с помощью ПЦР и секвенирования была обнаружена в лейкоцитарных клетках крови у 38% исследованных людей. Антитела IgG были обнаружены у 32%, IgM у 58% и IgA у 32% субъектов [114]. В научных трудах L. Martinez Cuesta et al. (2018) обсуждается проблема вероятности развития злокачественных новообразований у людей, в организме которых обнаружен *BLV* [142].

Ряд авторов рассматривают данный агент, как фактор, потенциально предрасполагающий к раку молочной железы у женщин [109, 114, 135, 154]. Важным аспектом является и тот факт, что ЭЛ и ВИ КРС можно рассматривать как «заболевания-спутники» [53]. По мнению D. Abdessemed et al. (2018) инфицирование крупного рогатого скота вирусом иммунодефицита (*BIV*) повышает риск заражения животных *BLV*, то есть высока вероятность микст-инфекции [103].

Согласно наиболее приемлемой в настоящее время теории, ретровирусы, используя различные механизмы воздействия на клеточный метаболизм, активируют пролиферацию инфицированных клеток, провоцируя при этом нестабильность генома и соматические изменения в клетках-носителях [128]. Данная стратегия позволяет возбудителям

осуществлять ретровирусную экспансию по двум направлениям: следствием пролиферации является «клонирование» ДНК провируса, кроме того, репликация инфекционных РНК-содержащих вирусных частиц наиболее интенсивно происходит в активно размножающихся клетках, нежели в покоящихся. Повышенная экспрессия мРНК в инфицированных лимфоцитах сопровождается значительными изменениями в продукции цитокинов и экспрессии антигенов иммунными клетками [124]. При этом установлено, что клетки животных с высоким индексом поликлональной пролиферации обладают повышенной жизнеспособностью [147].

При оценке гематологического статуса исследуемых животных нами были отмечены общие тенденции в изменении их гомеостаза. Количество эритроцитов и гемоглобина в крови *BLV*-, *BIV*- и *BLV/BIV*- инфицированных животных, а также показатель гематокрита были снижены в среднем в 1,7; 1,3 и 2,3 раз соответственно, по сравнению с группой интактных животных. При этом возрастало среднее содержание гемоглобина в эритроцитах инфицированных животных в 1,2; 1,4 и 1,6 раз соответственно, что служит маркером гиперхромной анемии. Признаком того, что это состояние связано с разрушением эритроцитов и носит компенсаторный характер свидетельствует возрастающий показатель ширины распределения эритроцитов по объему и увеличение среднего объема эритроцитов. В пользу данной теории свидетельствует повышенное содержание прямого и общего билирубина в 3,3-5,6 и 1,2-2,8 раз в сыворотке крови инфицированных животных по сравнению с интактными. Затрудненное выведение прямого билирубина с желчью является признаком нарушения гепатобилиарной системы, о чем свидетельствует увеличение активности аминотрансфераз, АСТ и АЛТ в 1,6-3,5 и 1,5-3,3 раз. Максимальные значения роста билирубина и активности ферментов отмечены у животных с микст-инфекцией, а минимальные – при *BIV*-инфекции. При этом гипоальбуминемия (45,4% / 19,2% / 2,5 раз) для *BLV*, *BIV* и микст-инфицированных животных соответственно, и увеличение концентрации креатинина (1,9% / 19 % / 2,1

раз) и мочевины (1,6% / 1,3% / 3,2 раз) являются маркерами почечной патологии. Состояние стресса и напряжения иммунной системы у инфицированных животных обусловлено увеличением содержания в их крови базофилов и эозинофилов.

Следует отметить, что несмотря на выявленные общие тенденции в изменении гомеостаза организма инфицированных животных, присутствовали и групповые особенности развития паталогического процесса. Так, у *BLV*-инфицированных животных регистрировали лейкоцитоз лимфоцитарного типа с уменьшением фракции нейтрофилов, что характеризует снижение эффективности киллерного звена адаптивного иммунитета. У *BIV*-инфицированных животных цитопения была обусловлена снижением фракции лимфоцитов, то есть можно констатировать дефект системы антигенпрезентации и продукции цитокинов. Для микст-инфицированных животных цитопения носила тотальный характер, что является маркером повреждения органов кроветворения и свидетельствует о снижении адаптивного иммунитета на всех его уровнях. Полученные нами данные коррелируют с мнением ряда авторов, что гематологический статус при лейкозе крупного рогатого скота характеризует состояние иммунной системы животных [57, 85].

Изучение структурных характеристик лимфоцитов крупного рогатого скота также позволило нам выявить общие и групповые тенденции при ретровирусных заболеваниях. Модуль упругости клеток при *BIV*-, *BLV*- и микст-инфекции достоверно снижался (33,1% - 35,8%) на фоне увеличения шероховатости (14,8% - 37,3%) и адгезивности (2,3-3 раз). С одной стороны, это может характеризовать усиление цитоскелета и стойкости инфицированных клеток, а с другой – увеличение их способности к миграции за счет образования ламеллоподий и склонности к агрегации, следствием чего может стать развитие аутоиммунных реакций у инфицированных животных. Ряд авторов отмечают прямую корреляцию между степенью

экспрессии некоторых молекул клеточной адгезии и гистологически установленной степенью злокачественности онкопатологии [162].

Изменение морфометрических параметров инфицированных ретровирусами лимфоцитов носило различный характер по группам животных. У крупного рогатого скота, инфицированного *BLV*, и при *BIV-BLV*-инфекции диаметр, высота, площадь и объем клеток достоверно снижались, особенно у микст-инфицированных животных, что может быть связано с развитием дегенеративных процессов в клетках или нарушением процесса их созревания. Особенно выражено это для микст-инфицированных клеток. Аналогичные тенденции выявляются при *HTLV-I* обусловленной патологии у людей. При *BIV*-инфекции морфометрические характеристики лимфоцитов, напротив, повышались по сравнению с клетками крови интактных животных, причиной чего может являться преобладание в крови бластных форм.

Результаты наших исследований свидетельствуют так же об изменении функционального состояния лимфоцитов при ретровирусных заболеваниях. По результатам МТТ-теста, у носителей *BLV*, *BIV* и микст-инфицированных животных митохондриальная активность лимфоцитов крови снижалась в 1,4; 3,8; 7,4 раза соответственно, чем у интактных. Снижение уровня функциональной генерации кислородных радикалов в лимфоцитах инфицированных животных свидетельствует о переходе клеток на менее энергетически емкий путь гликолиза (анаэробный), что сопровождается ослаблением тканевого дыхания. Вероятно, следствием этого является изменение кислотно-щелочного баланса клеток в сторону увеличения содержания кислых базофильных компонентов. По нашим данным коэффициент соотношения кислых и щелочных компонентов в лимфоцитах *BIV*, *BLV* и *BLV/BIV*-инфицированных животных оказался в 1,6; 1,8 и 2,6 раз выше, чем у интактных, что является маркером метаболического ацидоза клеток. Повышенная активность клеток, обусловленная продукцией

вирусных частиц и поликлональной пролиферацией лимфоцитов, приводит к накоплению недоокисленных промежуточных метаболитов.

Таким образом, изучение коррелятивной связи между гематологическим статусом инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота и морфофункциональным состоянием лимфоцитов их крови демонстрирует, что специфически обусловленное ретровирусами нарушение клеточного звена адаптивного иммунитета у животных сопровождается характерными изменениями, как на уровне инфицированной клетки, так и на уровне организма в целом и имеет совершенно четкие тенденции, что позволяет нам сделать соответствующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. Гематологические показатели инфицированных ретровирусами коров характеризуются присутствием маркеров гиперхромной анемии, повреждения печени и почек, аллергии.

2. У *BLV*-инфицированных животных отмечен лейкоцитоз лимфоцитарного типа на фоне уменьшения фракции нейтрофилов, при *BIV*-инфекции выражена лимфопения, для микст-инфицированных животных характерно состояние олигоцитемии на фоне относительного лимфоцитоза.

3. Биофизические показатели лимфоцитов крупного рогатого скота при ретровирусной инфекции характеризуются снижением эластичности на фоне увеличения шероховатости и адгезивности клеток.

4. Морфометрические характеристики *BLV*- и микст-инфицированных лимфоцитов достоверно снижаются, а при *BIV*-инфекции, напротив, повышаются по сравнению с клетками крови интактных животных.

5. Активность НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктаз лимфоцитов крови инфицированных ретровирусами коров снижается, что свидетельствует о переходе клеток на анаэробный тип гликолиза.

6. Коэффициент соотношения кислых и щелочных компонентов в лимфоцитах *BIV*, *BLV* и *BLV/BIV*-инфицированных животных увеличивается по сравнению с интактными, что является маркером метаболического ацидоза клеток.

7. *BLV-BIV*-инфекция сопровождается более глубокими изменениями гомеостаза на организменном и клеточном уровнях, нежели моно-инфекция, и характеризуется выраженными признаками иммуносупрессии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный способ получения лимфоцитов крупного рогатого скота (Решение о выдаче патента от 03.04.2020 по заявке 2019110642 от 10.04.2019), рекомендуется ветеринарным врачам, специалистам клинических лабораторий для проведения морфологических, биофизических, функциональных исследований агруноцитов (лимфоцитов) крупного рогатого скота при заболеваниях различного генеза.

2. Атомно-силовая микроскопия (АСМ), микроспектральный анализ и тест с нитросиним тетразолием (МТТ-тест) рекомендуются в качестве лабораторных методов исследования для комплексной оценки иммунопатологических состояний, изучения патогенеза, а также для дифференциации гематопатологических процессов, прогнозирования течения заболеваний и разработке комплекса лечебно-профилактических мероприятий.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработка выбранной темы является многообещающей при оценке степени повреждения иммунной и кроветворной систем при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота. Использование полученных значений в качестве референсных величин для оценки морфологических и биофизических параметров лимфоцитов крупного рогатого скота, их метаболической активности и физиологического статуса возможно при дифференциации иммунопатологических состояний и прогнозировании течения ретровирусных заболеваний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ - антигены

АСМ - атомно-силовая микроскопия

АСТ - аспартатаминотрансфераза

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АТ - антитела

БЛ (EVL) - бычий (энзоотический) лейкоз

ВИКРС - вирус иммунодефицита крупного рогатого скота

ВЛКРС - вирус лейкоза крупного рогатого скота

ГФДГ - глицерофосфат-дегидрогеназа

ИКС - иммунокомпетентная система

КРС - крупный рогатый скот

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

МЮ - модуль Юнга

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РИД - реакция иммунодиффузии

РЭС - ретикулоэндотелиальная система

СДГ - сукцинатдегидрогеназа

ЭРК - эпителиоретикулярные клетки

ЩФ - щелочная фосфатаза

BLV - bovine leukemia virus

BIV - bovine immunodeficiency virus

ОАК - общий анализ крови

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов, В.В. Принципы вегетативной регуляции функций иммунокомпетентных клеток: фундаментальное и прикладное значение / В.В. Абрамов, Т.Я. Абрамова, В.А. Козлов // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126, № 4. – С. 379-387.
2. Александров, И.Д. Фармакокоррекция при лейкозе крупного рогатого скота / И.Д. Александров // Межд. вестник ветеринарии. Тематический выпуск: Эффективные и безопасные ветеринарные лекарственные средства. СПб. - 2009. - № 2. - С. 126-129.
3. Алехин, Ю.Н. Функционально-метаболические изменения в организме плода в течение родов / Ю.Н. Алехин // Ветеринарный врач. - 2013. -№1.-С.45-47.
4. Антипова, Л.В. Анатомия и гистология сельскохозяйственных животных / Л.В. Антипова, В.С. Слободяник, С.М. Сулейманов // Современные проблемы науки и образования. – 2009. – № 1. С. 61-62.
5. Артемьев, Д.А. Применение АСМ для изучения морфометрических и биофизических характеристик лимфоцитов животных / Д.А. Артемьев, Б.Б. Костишко // Современные аспекты сельскохозяйственной микробиологии: Международная конференция. Москва, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Факультет почвоведения, агрохимии и экологии. 7-8 декабря 2016 г.: Материалы/ Отв. ред. Селицкая О.В., Свиридова Л.А. - М.:Антера принт, 2016. - С 90.
6. Артемьев, Д.А. Изучение биофизических свойств мембран лимфоцитов при BLV-инфекции / Артемьев Д.А., Костишко Б.Б., Красникова Е.С., Столбовская О.В. В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее Материалы II международной студенческой научно-практической конференции, 2016. - С. 95-100.
7. Артемьев, Д.А. Изучение биофизических параметров мембран лимфоцитов при BLV-инфекции / Артемьев Д.А., Красникова Е.С., Костишко

Б.Б., Столбовская О.В. Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. - 2016. - Т. 1., № 9. - С. 283-286.

8. Артемьев, Д.А. Изучение молекулярной ультраструктуры биологических мембран лимфоцитов при BLV - инфекции / Артемьев Д.А., Костишко Б.Б., Красникова Е.С., Столбовская О.В. Вестник медицинского института "РЕАВИЗ": реабилитация, врач и здоровье. - 2016. - № 2 (22). - С. 106-109.

9. Артемьев, Д.А. Атомно - силовая микроскопия биофизических параметров лимфоцитов при BLV - инфекции / Д.А. Артемьев, Е.С. Красникова. Всероссийский научный журнал «Территория инноваций». - 2016. - № 3 (3). - С. 4-10.

10. Артемьев, Д.А. Изучение механико-топографических параметров здоровых и BLV - инфицированных лимфоцитов коров методом АСМ / Д.А. Артемьев, Б.Б. Костишко // Молодежь – науке и практике АПК : материалы 101-й Международной научно-практической УО ВГАВМ; редкол : А. И. Ятусевич (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, ВГАВМ, 2016. - 85 - 86 с.

11. Артемьев, Д.А. Ультраструктурные особенности здоровых, BLV и BIV лимфоцитов КРС / Д.А. Артемьев, Е.С. Красникова, О.С. Столбовская, Б.Б. Костишко // Сборник статей научно-информационного центра «Знание» по материалам XX международной заочной научно-практической конференции: «Развитие науки в XXI веке» 2часть, г.Харьков: сборник со статьями (уровень стандарта, академический уровень). –Х. : научно-информационный центр «Знание», 2017.– 5 - 8 с.

12. Артемьев, Д.А. Сравнительный анализ структурных особенностей лимфоцитов крупного рогатого скота с ретровирусной инфекцией и без нее с использованием атомно - силовой микроскопии / Д.А. Артемьев, Е.С. Красникова, А.В. Красников, О.С. Столбовская, Б.Б. Костишко // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых

ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны».- СПб, Издательство ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017. – 14 - 15 с.

13. Артемьев, Д.А. АСМ – сканирование лимфоцитов инфицированных ретровирусами коров / Артемьев Д.А. В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий материалы Международной научно-практической конференции, 2017. - С. 154-158.

14. Артемьев, Д.А. Исследование структурных особенностей здоровых и инфицированных ретровирусами лимфоцитов крупного рогатого скота с помощью атомно - силовой микроскопии / Д.А. Артемьев, А.В. Красников, Е.С. Красникова. Актуальные вопросы в науке и практике / Сборник статей по материалам III международной научно-практической конференции (4 ноября 2017 г., г. Казань). В 4 ч. Ч.2 / – Уфа: Изд. Дендра, 2017. –33 - 44 с.

15. Артемьев, Д.А. Сравнительный анализ функциональной активности лимфоцитов крупного рогатого скота при BLV и BIV инфекции / Д.А. Артемьев, А.В. Красников, С.В. Козлов, Е.С. Красникова, С.А. Калганов. Научная жизнь. - 2019. - Том 14, № 5. - С. 714 - 723.

16. Артемьев Д.А. Особенности механизма иммунной системы крупного рогатого скота (обзор литературы) / Д.А. Артемьев, А.В. Красников, Е.С. Красникова, С.В. Козлов. Научная жизнь. - 2019. - Том 14, № 6. - С. 975 - 982.

17. Артемьев, Д.А. Исследование лимфоцитов здоровых и FeLV-инфицированных кошек методом АСМ / Д.А. Артемьев, Б.Б. Костишко // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы VIII Международной студенческой научной конференции. 22-23 апреля 2015 г. - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2015. - Том I. - С. 18-20.

18. Артемьев, Д.А. Разработка и внедрение способа диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Д.А. Артемьев // Материалы всероссийского фестиваля научного творчества "Инновационный потенциал

молодёжи - 2016" (Естественные науки). – Ульяновск: «Первая цифровая типография», 2016. – 176 - 178 с

19. Баженова, И.А., Кузнецова, Т.А. Основы молекулярной биологии. Теория и практика: Учебное пособие. -СПб.: Издательство «Лань», 2018.-140 с.

20. Батенева, Н.В. Изучение распространения условных генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота / Н.В. Батенева, П.Н. Смирнов, И.В. Михнович // С-х. биол.–2012. –№ 4. –С.69–72.

21. Белов, А.А. Эксфузионно-инфузионные методы очищения крови. Классификация. Терапевтический (лечебный) плазмаферез и механизм действия на организм // Вестник АГИУВ. - 2013. - №4. - С.69-74.

22. Белобороденко, А.М. Физиология адаптации и гомеостаз коров в условиях резко-континентального климата / А.М. Белобороденко, М.А. Белобороденко, Т.А. Белобороденко, И.А. Родин // Ветеринария Кубани. - 2014. - № 5. - С. 23-25.

23. Бердюгина, О.В. Функционально-метаболические изменения иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких (обзор литературы) / О.В. Бердюгина, С.Н. Скорняков, И.Д. Медвинский и др. // Уральский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 121–127.

24. Бобкова, Г.Н. Лейкоз крупного рогатого скота / Г.Н. Бобкова, П.П. Шамаро, Т.А. Прудникова // Вестник Брянской ГСХА. 2011 . С. 42–48.

25. Богданов, А.В. Патологическая физиология и патологическая анатомия животных: Учебник / А.В. Богданов, Ю.В. Голубенко. - СПб.: Лань, 2014. - 416 с.

26. Богомолова, Е.С. Анатомия и физиология животных: Учебник / Е.С. Богомолова, М.Я. Брынь, В.А. Коугия и др. - СПб.: Лань, 2015. - 368 с.

27. Борисова, Т.К. Дендритные клетки: морфология и функции / Т.К. Борисова // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126, № 1. – С. 77-86.

28. Васильев, Ю.Г. Цитология, гистология, эмбриология: учебник / Ю.Г. Васильев, Е.И. Трошин, Д.С. Берестов, Д.И. Красноперов: под

редакцией Ю.Г. Васильева, Е.И. Трошина. - Санкт-Петербург: Лань, 2020. - 648 с. +CD.-(Учебники для вузов. Специальная литература).

29. Виноградова, И.В. Геноеографические исследования вируса лейкоза крупного рогатого скота / И.В. Виноградова, Е.А. Гладырь, Н.В. Ковалюк, М.В. Петропавловский, И.М. Донник, Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева // Достижения науки и техники АПК. 2011. - №10. - С. 34–37.

30. Владимирская, Е.Б. Нормальное кроветворение и его регуляция / Е.Б. Владимирская // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. -2015. - №. 2. - С.109-119.

31. Власенко, В. С. Сравнительная оценка метаболизма нейтрофилов по реакции хемилюминесценции и восстановления нитросинего тетразолия у крупного рогатого скота при лейкозе / В. С. Власенко, Г. М. Дюсенова, А. И. Иванов, В. А. Кузьмин, О. Р. Полякова, А. С. Кисиль // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. Изд. : Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины. – 2017. – № 1. – С. 23–26

32. Волкова, С.А. Основы клинической гематологии: учебное пособие / С.А. Волкова, Н.Н. Боровков. — Н. Новгород: Издательство Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. — 400 с.

33. Госманов, Р.Г. Иммунология : учебное пособие / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, Р. Х. Равилов [и др.]. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2018. — 188 с.

34. Госманов, Р.Г. Практикум по ветеринарной микробиологии и микологии: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, А.А. Барсков. - СПб.: Издательство «Лань», 2014.-384 с.

35. Григорьев, В.С. Органогенез центральных и периферических органов иммунной системы у сельскохозяйственных животных / В.С. Григорьев, Г.В. Молянова // Самарская государственная сельскохозяйственная академия. - Самара, 2009.-180 с.

36. Гуськова, Т.В. Состояние клеточного иммунитета при лейкозе крупного рогатого скота/ Т.В. Гуськова, С.Г. Лапшанков, Н.Н. Гугушвили,

Т.А. Инюкина, Е.А. Горпинченко, И.В. Сердюченко// В сборнике: Научное обеспечение агропромышленного комплекса. Сборник статей по материалам X Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию И. С. Косенко, 2017. - С. 177-178.

37. Гущина, Ю.Ю. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии / Ю.Ю. Гущина, С.Н. Плескова, М.Б. Звонкова // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. -2005.-№ 1.-С. 48-53.

38. Диагностическая система для выявления ДНК провирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота методом мультиплексной полимеразной цепной реакции / Е.С. Красникова, О.С. Ларионова, А.В. Красников, Г.Х. Утанова, А.С. Белякова // Патент № 2615465 по заявке 2015132112 от 31.07.2015 опубликован 04.04.2017 Бюл. № 10.–14 с.

39. Донник, И.М. Пути повышения резистентности у телят / И.М. Донник, И.А. Шкуратова // Актуальные проблемы сохранения и развития биологических ресурсов: мат. междунар. науч.-практ. конф. 2015. С. 88–91.

40. Дьячкова, С.Я. Иммунология: учебное пособие/С.Я. Дьячкова. - 2-е изд., испр. - Санкт-Петербург: Лань, 2020. - 168 с.: ил. - (Учебники для вузов. Специальная литература).

41. Максимов, В. И. Основы физиологии и этологии животных: учебник / В. И. Максимов, В. Ф. Лысов. — 2-е изд., испр. и доп. — Санкт-Петербург: Лань, 2019. — 504 с. — ISBN 978-5-8114-3818-1.

42. Жуков, В.М. Органопатология иммунной системы животных: Учебное пособие. - СПб.: Издательство «Лань», 2018.-136с.: ил.-(Учебники для вузов. Специальная литература).

43. Завалишина С.Ю. Физиология крови и кровообращения: Учебное пособие / С.Ю. Завалишина, Т.А. Белова, И.Н. Медведев, Н.В. Кутафина // Под общей редакцией профессора И.Н. Медведева. - СПб.: Издательство «Лань», 2015. - 176 с.: ил. - (Учебники для вузов. Специальная литература).

44. Земсков, А.М. Неспецифичные и специфичные механизмы антиинфекционного иммунитета / А.М. Земсков, В.А. Земскова, Т.А. Бережнова, Я.В. Кулинцова, К.С. Дядина, А.В. Ларин, Д.И. Коруняк // Прикладные информационные аспекты медицины. - 2018. - №1. - С.176-183.

45. Земсков, В.М. Современная концепция и общие закономерности иммуномодулирующей терапии / В.М. Земсков // Успехи современной биологии. - 2014. - Т. 134., № 1. - С. 26-34.

46. Зубова, Т.В. Современные методы и опыт борьбы с лейкозом крупного рогатого скота / Т.В. Зубова, В.А. Плешков, А.Н. Миронов // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. - 2018.- №5. – С. 12-18.

47. Иванов, О.В. Рекомендации по практической диагностике и оздоровлению стад крупного рогатого скота от лейкоза / О.В. Иванов, О.Ю. Иванова // Farm Animals. - 2015. - №1. С. 22–24.

48. Иммунология: Учебное пособие. - 3-е изд., стер. - СПб.: Издательство «Лань», 2018. - 188 с. - (Учебники для вузов. Специальная литература).

49. Красников, А.В. Использование микроспектрального анализа для оценки морфофункционального статуса иммунокомпетентных клеток при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота / А.В. Красников, Д.А. Артемьев, Е.С. Красникова, С.В. Козлов // Аграрный вестник Урала. - 2020. - №06(197). - С. 58-65.

50. Красников, А.В. Возможности микроспектрального анализа при изучении клеточного метаболизма / А.В. Красников, С.В. Козлов, Д.А. Артемьев // Наука и Образование: материалы 72-ой Международной научно-практической конференции студентов и аспирантов «Агровуз-2020: образование, наука, инновации». – 2020. - № 2. – режим доступа: <http://opusmgau.ru/index.php/see>.

51. Красникова, Е.С. Сравнительный анализ гематологических показателей крупного рогатого скота при ретровирусных заболеваниях / Е.С. Красникова, С.В. Козлов, Д.А. Артемьев // Наука и Образование: материалы

72-ой Международной научно-практической конференции студентов и аспирантов «Агровуз-2020: образование, наука, инновации». – 2020. - № 2. – режим доступа: <http://opusmgau.ru/index.php/see>.

52. Красникова, Е.С. Биохимические изменения крови крыс линии Wistar при экспериментальной BLV-инфекции / Е.С. Красникова, А.В. Красников, Р.В. Радионов, Д.А. Артемьев, В.И. Околелов // Инновации и продовольственная безопасность. - 2019. - №2 (24). - С. 69-75.

53. Красникова, Е.С. Гемато-биохимический статус коров при BLV- и BIV-инфекции / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, А.В. Кудинов // Научная жизнь. 2016. № 2. С. 159-167.

54. Красникова, Е.С. Изучение структурно-функционального состояния лимфоцитов здоровых и FeLV - инфицированных кошек методом атомно-силовой микроскопии / Красникова Е.С., Столбовская О.В., Артемьев Д.А., Костишко Б.Б // Научная жизнь. - 2014. -№ 6. - С. 156-162.

55. Красникова, Е.С. Изучение влияния FIV и FELV - инфекции на биометрические характеристики лимфоцитов кошек / Е.С. Красникова, О.В. Столбовская, Б.Б. Костишко, Д.А. Артемьев, Е.А. Фауст // Аграрный научный журнал. - 2016. - № 11. - С. 21-24.

56. Красникова, Е.С. Молокосырье от коров, инфицированных возбудителями ретровирусных инфекций крупного рогатого скота: вопросы безопасности и качества вырабатываемой продукции / Е.С. Красникова, О.С. Ларионова, А.В. Красников, Г.Х. Казиева // Вопр. питания. - 2018. - Т. 87, № 4. - С. 48–55.

57. Кузнецова, А.Е. Влияние метаболических процессов на устойчивость крупного рогатого скота к лейкозу / А.Е. Кузнецова, В.Н. Ласкавый, Е.И. Тихомирова, Н.В. Симоненко, М.М. Вакараева // Вестник Чеченского государственного университета. - 2017.- № 2 (26).- С. 101-106

58. Куликов, В. А. Метаболическое перепрограммирование раковых клеток / В. А. Куликов, Л. Е. Беляева // Вестник ВГМУ. – 2013. – № 2. – С. 6–18.

59. Лелевич, С.В. Клиническая биохимия: учебное пособие / С.В. Лелевич.-3-е изд., стер. - Санкт-Петербург: Лань, 2020.-304 с.

60. Логинов, А.Г. Состояние энергетического метаболизма лимфоцитов регионарного лимфатического узла при имплантации никелида титана / А.Г. Логинов // БЮЛЛЕТЕНЬ СО РАМН. - 2005. - Т. 116, №2.-С . 139-142.

61. Максимчик, П.В. Клеточная энергетика как мишень для элиминирования опухолевых клеток (обзор) / П.В. Максимчик, А.В. Куликов А.В., Б.Д. Животовский, В.Г. Гогвадзе // Биохимия. - 2016. - Т. 81 ,№ 2. - С. 147-165.

62. Манских, В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / В.Н. Манских // Цитология. - 2007. - Т. 49, № 11. - С. 909-915.

63. Марушева, Ю.А. Изучение вязко-эластических и топографических свойств лимфоцитов при FIV и FELV-инфекции / Марушева Ю.А., Костишко Б.Б., Артемьев Д.А. // Материалы XV Международной научно-практической конференции «Современные тенденции сельскохозяйственного производства в мировой экономике», 2016. - С. 271-275.

64. Матюхина, Т.Г. АСМ - исследование клеток сердечно-сосудистой системы и крови. проблемы и надежды / Т.Г. Матюхина, О.Ю. Комков, С.А. Чижик // БЕЛСЗМ-4, Гомель, 24–25 октября 2000 г. – с. 44-47.

65. Мойбенко, А.А. Ферментативные механизмы апоптоза / А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, В.С. Нагибин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2005. — № 3. - С. 17—26

66. Молянова, Г.В. Клеточный состав вилочковой железы в предплодную и плодную фазы развития крупного рогатого скота / Г.В. Молянова, В.С. Григорьев, В.И. Максимов // Ветеринарная медицина: научно-практический журнал. – М., 2007. – №2-3. – С. 24-25.

67. Москалева, Е.Ю. Возможные механизмы адаптации клетки к повреждениям, индуцирующим программированную гибель. Связь с патологией / Е.Ю. Москалева, СЕ. Северин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2006. - № 2. - С. 2-16.

68. Нагоев, Б.С. Изменение активности показателя функционально-метаболической активности лейкоцитов при гриппе и постгриппозной пневмонии / Б. С. Нагоев, А. М. Бецукова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 4. – С. 85–86.

69. Нагоев, Б.С. Функционально - метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных рецидивирующей герпетической инфекцией / Б. С. Нагоев, З. А. Камбачокова // Журнал инфектологии. – 2011. – Т. 3. – № 3. – С. 38-41.

70. Новодержкина, Ю.К. Конфигурация и поверхность клеток в норме и патологии / Ю.К. Новодержкина, З.Г. Шишканова, Г.И. Козинец. – М.: Триада-фарм, 2004. – 152 с.

71. Околелов, В.И. Применение спектрофотометрии для диагностики лейкоза крупного рогатого скота / В.И. Околелов, С.П. Божко, В.Г. Ощепков // Проблемы стабилизации и развития сельскохозяйственного производства Сибири, Монголии и Казахстана в XXI веке. Ч. 2.: тез. докл. Межд. науч.– практ. конф. Новосибирск, 1999. С. 235–238

72. Орадова, А.Ш. Лабораторная диагностика цитокинов (обзорная статья) / А.Ш. Орадова, З.К. Канжигалина, Р.К. Касенова // Вестник Казахского Национального медицинского университета. - 2015. - №. 1. - С. 357-360.

73. Петрова, О.Г. Показатели иммунной и метаболической системы у коров / О.Г. Петрова, М.И. Барашкин // АВУ. - 2016. - №9 (151). – С. 3-9.

74. Петрухин, О.М. Аналитическая химия. Химические методы анализа: Учебное пособие / О.М. Петрухин. - М.: Альянс, 2016. - 400 с.

75. Пинегин, Б.В. Физиология иммунной системы и иммунопатология / Б.В. Пинегин, А.Н. Ильинская // Физиология и патология иммунной системы. - 2004. - Т. 8, № 11. - С. 13-18.

76. Плескова, С.Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях: учебное пособие / С. Н. Плескова. -М.: Интеллект, 2011.-183с.

77. Пономаренко, Д.А. Особенности диагностики и клинико-иммунологического проявления лейкоза крупного рогатого скота / Д.А. Пономаренко, С.Д. Абакин, Е.В. Калашникова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2011. - № 9. - С. 20–24.

78. Пономаренко, Д.Г. Патоморфологическое проявление иммунодефицита у крупного рогатого скота при лейкозе / Д.Г. Пономаренко, С.С. Абакин, Т.И. Лапина // Ветеринарный врач. - 2009. - № 1. - С. 19-22.

79. Ребезов, М. Б. Коррекция иммунного статуса у крупного рогатого скота / М.Б. Ребезов, Г.М. Топурия, Л.Ю. Топурия // Животноводство и кормопроизводство. - 2016. - №2 (94). – С 9-14.

80. Рукавицына, О.А. Гематология: национальное руководство / под ред. О. А. Рукавицына. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2017. — 784 с.

81. Руска, Э. Развитие электронного микроскопа и электронной микроскопии / Э. Руска // Успехи физических наук.-1988.-Т.154, Вып.2 – с. 243–259.

82. Саенко, О.Е. Аналитическая химия: учебник / О.Е. Саенко. - РнД: Феникс, 2018. - 284 с.

83. Сеницына, О.В. Атомно-силовой микроскоп - сенсор единичных вирусных частиц / О.В. Сеницына, Г.Б. Мешков, И.В. Яминский // Медицина и высокие технологии.-2016.-№3.-С.23-26.

84. Скориков, А.В. Показатели лейкоцитарного профиля и резистентности крупного рогатого скота при проведении противолейкозных мероприятий / А.В. Скориков, Н.Ю. Басова, М.А. Староселов, С.В. Пруцаков, Н.Н. Кружнов, Е.В. Иванасова, П.Н. Смирнов, А.Н. Марков // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. - 2018. - Т. 7., № 3. - С. 193-198

85. Смирнов, П.Н. Иммуноморфологические изменения, сопровождающие развитие гемобластозов человека и животных / П.Н. Смирнов, В.В. Храмцов, С.Н. Магер, В.В. Разумовская, М.А. Амироков, И.В.

Тюньков // Инновации и продовольственная безопасность. - 2017. - № 4 (18). - С. 39-50.

86. Смирнов, Ю. П. Оценка степени иммунодепрессивности организма у инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота/ Ю.П. Смирнов, И.Л. Суворова // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. - 2016. - №2 (51). – С. 14-27.

87. Смирнов, Ю. П. Возможности иммуномодуляции для повышения устойчивости телят к заражению вирусом лейкоза / Ю.П. Смирнов, И.Л. Суворова // Аграрная наука Евро-Северо-Востока.- 2017.- №5 (60). – С. 34-39.

88. Смоленцев, С.Ю. Нормализация иммунитета крупного рогатого скота препаратами "Иммуноферон" и "Риботан" / С.Ю. Смоленцев, Э.К. Папуниди, Г.Р. Юсупова, А.Х. Волков, Р.Э. Хабибуллин // Вестник Казанского технологического университета. - 2014. - Т. 17. - № 20. - С. 196-199.

89. Способ получения лимфоцитов крупного рогатого скота / Д.А. Артемьев, С.В. Козлов, Е.С. Красникова, А.В. Красников // Решение о выдаче патента от 03.04.2020 по заявке 2019110642 от 10.04.2019.

90. Староселов, М. А. Иммунобиологические показатели инфицированных вирусом лейкоза КРС и больных лейкозом коров в сравнении с интактными / М.А. Староселов, Н.Ю. Басова / Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. - 2008. - №40. – С. 39-45.

91. Стегний, Б.Т. Современные аспекты лейкоза крупного рогатого скота / Б.Т. Стрегний, О.В. Шаповалова, С.К. Горбатенко, А.Н. Корнейков, В.М. Горжеев // Ветеринарная медицина. - 2013. - Вып. 97. - С. 242–255.

92. Сыроешкин, А.В. Новый подход к исследованию патофизиологии клетки: изучение распределения клеток по размерам и форме как метод диагностики и мониторинга заболеваний / А.В. Сыроешкин, Т.В. Гребенникова, В.Н. Байкова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 5. – С. 35-40.

93. Топурия, Л.Ю. Коррекция иммунного статуса у телят в молочный период выращивания /Л.Ю. Топурия // Аграрный вестник Урала. - 2016. - № 10 (152). - С. 68-71.

94. Топурия, Л.Ю. Основные принципы иммунокоррекции в ветеринарной медицине / Л.Ю. Топурия, Г.М. Топурия // Ветеринария Кубани. - 2010. - №4. - С. 3–4.

95. Труфакин, В. А. Функциональная морфология клеток иммунной системы в эксперименте и в клинике / В.А. Труфакин, А. В. Шурлыгина, М.В. Робинсон // Морфология. - 2005. - Т. 128, № 4. -С. 20-24.

96. Федоренко, И. С. Микробиология и иммунология: учебное пособие / И.С. Федоренко, С.П. Перерядкина, Е.А. Харламова. — Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2017. — 100 с.

97. Федоров, Ю.Н. Стратегия и принципы иммунокоррекции и иммуномодулирующей терапии / Ю.Н. Федоров, В.И. Клюкина, М.Н. Романенко // Вестник Новгородского государственного университет им. Ярослава Мудрого. - 2015. - № 3–1. - С. 84–86.

98. Хабузов, И.П. К вопросу о некоторых показателях иммунного статуса у молодняка крупного рогатого скота / И.П. Хабузов // Ветеринарная патология. - 2011. - № 1-2. - С. 89-92.

99. Хаитова Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 640 с.

100. Шилов, В.Н. Молекулярные механизмы структурного гомеостаза / В.Н. Шилов. – М.: Интерсигнал, 2006. – 288 с.

101. Яминский, И.В. Сканирующая зондовая микроскопия как главный инструмент бионаноскопии / И.В. Яминский [и др.] // Медицина и высокие технологии.-2014.-№2.-С.11-26.

102. Abdala, A. BLV: lessons on vaccine development / A. Abdala, I. Alvarez, H. Brossel, L. Calvinho, H. Carignano, L. Franco, H. Gazon, C. Gillissen, M. Hamaidia, C. Hoyos, JR. Jacques, T. Joris, F. Laval, M. Petersen, F. Porquet,

N. Porta, V. Ruiz, R. Safari, G. Suárez Archilla, K. Trono, L. Willems // *Retrovirology*. – 2019. - № 7;16(1). - P.26.

103. Abdessemed, D. Population and biological preconditions for the cattle retroviruses' expansion / D. Abdessemed, E.S. Krasnikova, V.A. Agoltsov, A.V. Krasnikov // *Theoretical and Applied Ecology*. - 2018. - No. 3. - P. 116-124.

104. A-Hassan, E. Relative Microelastic Mapping of Living Cells by Atomic Force Microscopy / E. A-Hassan [et al.] // *Biophysical Journal*.-1998.- Vol. 74.-P. 1564–1578.

105. Alonso, J.L., Goldmann WH. Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology / J.L. Alonso, W.H. Goldmann // *Life Sci*. -2003.-Vol.2 (23).-P.2553-2560.

106. Arriagada, G. Retroviruses and microtubule-associated motor proteins / Arriagada G // *Cell Microbiol*. – 2017. - №19(9). doi: 10.1111/cmi.12759.

107. Artemev, D.A. Application of a microspectral analysis for evaluation of the morphofunctional status of immunocompetent cells in cattle with retroviral diseases / D.A. Artemev, A.V. Krasnikov, E.S. Krasnikova, S.A. Kalganov, E.A. Markova // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2020. – No 1515. – P. 052001.

108. Artemev, D.A. The study of the structural features of the lymphocytes from cattle with and without retroviral infection using atomic force microscopy / D.A. Artemev, E.S. Krasnikova, A.V. Krasnikov, R.V. Radionov, O.V. Stolbovskaya, B.B. Kostishko // *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE 5, Optical Technologies in Biophysics and Medicine, 2018*. - C. 107160G.

109. Baltzell, K.A. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas / K.A. Baltzell, H.M. Shen, S. Krishnamurthy, J.D. Sison, G.J. Nuovo, G.C. Buehring // *Cancer*. - 2018. - No. 124(7). - P. 1342-1349.

110. Barez, P.Y. Recent Advances in BLV Research / P.Y. Barez, A. de Brogniez, A. Carpentier, H. Gazon // *Viruses*. – 2015. - № 24;7(11). - P.6080-8.

111. Bhatia, S. Bovine immunodeficiency virus: a lentiviral infection / S. Bhatia, S.S. Patil, R. Sood // *Indian J Virol.* – 2013. - № 24(3). - P.332-41.
112. Binnig, G. Atomic force microscope / G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber // *Phys. Rev. Lett.* -1986.-Vol. 56.-P.930 –933.
113. Bolshakova, A.V. Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy / A.V. Bolshakova [et al.] // *Biotechnol Prog.*-2004.-Vol.20(6).-P.1615-22.
114. Buehring, G.C. Bovine leukemia virus discovered in human blood/ G.C. Buehring, A. DeLaney, H. Shen, D.L. Chu, N. Razavian, D.A. Schwartz, Z.R. Demkovich, M.N. Bates // *BMC Infect Dis.* - 2019. - No. 19(1). doi:10.1186/s12879-019-3891-9.
115. Buehring, G.C. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development / G.C. Buehring, H. Shen, D.A. Schwartz, J.S. Lawson // *PloS one.* - 2017. - No. 2(6). - P. 0179367.
116. Buechner, C.N. DNA substrate preparation for atomic force microscopy studies of protein-DNA interactions / C.N. Buechner, I. Tessmer // *J Mol Recognit.*-2013.-Vol. 26(12).-P.605-17.
117. Chen, S.W. Nanoscale structural features determined by AFM for single virus particles/ S.W. Chen, M. Odorico, M. Meillan, L. Vellutini, J.M. Teulon, P. Parot, B. Bennetau, J.L. Pellequer // *Nanoscale.* -2013.-Vol.5(22).-P.10877-86.
118. Clausen-Schaumann, H. Force spectroscopy with single bio-molecules / H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, H. Gaub // *Curr Opin Chem Biol.*- 2000.- Vol.4.-P. 524–530.
119. De Pablo-Maiso, L. Prospects in Innate Immune Responses as Potential Control Strategies against Non-Primate Lentiviruses / L. de Pablo-Maiso, A. Doménech, I. Echeverría, C. Gómez-Arrebola, D. de Andrés, S. Rosati, E. Gómez-Lucia, R. Reina. *Viruses.* – 2018. - № 17;10(8).- pii: E435;

120. De Pablo, P.J. Atomic force microscopy of viruses / P.J. de Pablo // *Subcell Biochem.*- 2013.-Vol.68.-P.247-271.
121. Dufrene, Y.F. AFM for nanoscale microbe analysis / Y.F. Dufrene // *Analyst.*-2008.-Vol. 133.-P.297-301.
122. Engel, A. Observing single bimolecular at work with the atomic force microscope / A. Engel, D.j. Muller // *Nature structural biology.*-2000.-Vol.7.-P. 715-718.
123. Francis, L.W. Atomic force microscopy comes of age / L.W. Francis [et al.] // *Biol Cell.* -2009.- Vol.102(2).-P.133-143.
124. Frie, M.C. Bovine Leukemia Virus: A Major Silent Threat to Proper Immune Responses in Cattle / M.C. Frie, P.M. Coussens // *Veterinary Immunology and Immunopathology.* - 2015. - № 163(3-4). - P. 103-114.
125. Gadegaard, N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques / N. Gadegaard // *Biotechnic. Histochemistry.*- 2006.-Vol. 81.-P. 87-97.
126. Gaub, H.E. Measuring Cell Adhesion Forces with the Atomic Force Microscope at the Molecular Level Martin Benoit / H.E. Gaub // *Cells Tissues Organs.*- 2002.-Vol.172.-P.174–189.
127. Gaub, H.E. The molecular elasticity of individual proteins studied by AFM-related techniques / H.E. Gaub, J.M. Fernandez // *AvH-Magazin.*- 1998.- Vol.71.-P.11–18.
128. Gazon, H. How Does HTLV-1 Undergo Oncogene-Dependent Replication Despite a Strong Immune Response? / H. Gazon, P. Chauhan, M. Hamaidia, C. Hoyos, L. Li, R. Safari, L. Willems // *Front. Microbiol.* - 2017. – No3 (79). - P. 2684.
129. Gautam, S. Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus (BLV) Strains Reveals Existence of Genotype 6 in Cattle in India with evidence of a new subgenotype / S. Gautam, N. Mishra, S. Kalaiyarasu, S.K. Jhade, R. Sood. *Transbound Emerg Dis.* – 2018. - № 65(6). P.1968-1978.

130. Goldsbury, C.S. Introduction to atomic force microscopy (AFM) in biology / C.S. Goldsbury, S. Scheuring, L. Kreplak // *Curr Protoc Protein Sci.* - 2009.-Chapter 17,Unit 17.-P.1-19.

131. Hansma, H. G. Probing biopolymers with the atomic force microscope: A review / H. G. Hansma [et al.] // *J. Biomater.*-2000.- Vol. 11 (7).-P. 675 –683.

132. Hinterdorfer, P. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic orce microscopy / P. Hinterdorfer, Y. Dufrene // *Nature methods.*-2006.-Vol.3, - №5.-P. 347-348.

133. Hodges, J.A. Sample Preparation for Single Virion Atomic Force Microscopy and Super-resolution Fluorescence Imaging / J.A. Hodges, S. Saffarian // *J Vis Exp.* -2014.-Vol.2(83).-P. 13097.

134. Hsieh, J.C. Molecular Epidemiological and Serological Studies of Bovine Leukemia Virus in Taiwan Dairy Cattle / J.C. Hsieh, C.Y. Li, W.L. Hsu, S.T. Chuang // *Front Vet Sci.* – 2019. - № 6;6. P.427.

135. Khalilian M. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women / M. Khalilian, S.M. Hosseini, O. Madadgar // *Microbial Pathogenesis.* - 2019. - No.135. - P. 103566.

136. Krasnikova, E.S. Comparative analysis of cats' lymphocytes structural features with and without retroviral infection using atomic force microscopy / E.S. Krasnikova, D.A. Artemev, A.V. Krasnikov, O.V. Stolbovskaya, B.B. Kostishko // *Journal of Physics: Conference Series Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations; Polytechnical Institute of Siberian Federal University. Bristol, United Kingdom, 2019. - C. 22013.*

137. Kuznetsov, Y.G. Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes / Y.G. Kuznetsov, J.G. Victoria, W.E. Robinson Jr., A. McPherson // *J Virol.*- 2003.-Vol. 77(22).-P.11896-909.

138. Lin, A.C. A novel sample holder allowing atomic force microscopy on transmission electron microscopy specimen grids: repetitive, direct correlation

between AFM and TEM images / A.C. Lin, M.C. Gosh // *Journal of Microscopy*.2002.- Vol. 205.-P. 205–208.

139. Lower, S.K. Atomic force microscopy to study intermolecular forces and bonds associated with bacteria / S.K. Lower // *Adv Exp Med Biol*. -2011.- Vol.715.-P.285-99.

140. Martín-Molina, A. Adsorption of DNA onto anionic lipid surfaces / A. Martín-Molina [et al.] // *Adv Colloid Interface Sci*. -2013.- Nov 27.- P.9.

141. Mongin, A.A. Mechanisms of cell volume regulation and possible of the cell volume sensor / A.A. Mongin, S.N. Orlov // *Patophysiology*. – 2006. – V. 8. – P. 77-88.

142. Martinez Cuesta, L. Can Bovine Leukemia Virus Be Related to Human Breast Cancer? A Review of the Evidence / L. Martinez Cuesta, P.A. Lendez, M.V. Nieto Farias, G.L. Dolcini, M.C. Ceriani // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. - 2018. - No. 23(3). - P. 101-107.

143. Matzke, R. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells / R. Matzke [et al.] // *Nat. Cell Biol*. -2001.- Vol.3.-P.607–610.

144. McPherson, A. Atomic force microscopy investigation of viruses / A. McPherson, Y.G. Kuznetsov // *Methods Mol Biol*. - 2011. - Vol.736.-P.171-195.

145. Meade, A.D. Prediction of DNA damage and G2 chromosomal radiosensitivity ex vivo in peripheral blood mononuclear cells with label-free Raman micro-spectroscopy / A.D. Meade, A. Maguire, J. Bryant, D. Cullen, D. Medipally, L. White, B. McClean, L. Shields, J. Armstrong, M. Dunne, E. Noone, S. Bradshaw, M. Finn, A.M. Shannon, O. Howe, F.M. Lyng // *Int J Radiat Biol*. - 2019. -№ 95(1). - P. 44-53.

146. Moreno-Herrero, F. Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids / F. Moreno-Herrero [et al.] // *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. - 2004 .- Vol. 69.- P.3.

147. Nieto Farias, M.V. Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high

and low proviral load / M.V. Nieto Farias, F.N. Souza, P.A. Lendez, L. Martínez-Cuesta, K.R. Santos, AMMP Della Libera, M.C. Ceriani, G.L. Dolcini // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. - 2018. - No. 206. - P. 41-48.

148. Ohnesorge, F.M. AFM review study on pox viruses and living cells / F.M. Ohnesorge [et al.] // *Biophys J*. -1997.-Vol.73(4).-P.2183-2194.

149. Otto, K. Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion / K. Otto // *Res Microbiol*.- 2008.-Vol. 159(6).-P.415-22.

150. Passos-Castilho, A.M. B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication / A.M. Passos-Castilho, C. Marchand, D. Archambault // *Virology*. – 2018. - № 515. - P.158-164.

151. Pinheiro, M.M. Sitagliptin inhibit human lymphocytes proliferation and Th1/Th17 differentiation in vitro / M.M. Pinheiro, C.L. Stoppa, C.J. Valduga, C.E. Okuyama, R. Gorjão, R.M. Pereira, S.N. Diniz // *Eur J Pharm Sci*. - 2017. - №30;100. – P.17-24.

152. Radmacher, M. Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy / M. Radmacher // *Methods Cell Biol*. - 2007. - Vol.83. - P.347-372.

153. Rico, F. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips / F. Rico [et al.] // *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. -2005.- Vol.72.-P.2.

154. Schwingel, D. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil / D. Schwingel, A. Andreolla, L. Erpen, R. Frandoloso, K. Carlos // *Scientific Reports*. - 2019. - №. 9(1). - P. 7-30.

155. Simon, A. Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion / A. Simon, M.C. Durrieu // *Micron*.- 2006.-Vol.37(1).-P.1-13.

156. Stolbovskaya, O.V. The study of the structural features of the lymphocytes in patients with diabetes using atomic force microscopy / O.V. Stolbovskaya, R.M. Khairullin, B.B. Kostishko, E.S. Pchelintseva, E.S.

Krasnikova, A.A. Fomin, A.A. Skaptsov // Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE. - 2016. - C. 99171P.

157. Tao, N. Measuring the microelastic properties of biological material / N. Tao, S.M. Lindsay, S. Lees // Biophysical Society.-1992.- Vol. 63.-P. 1165-1169.

158. Ubbink, J. Probing bacterial interactions: integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques / J. Ubbink, P. Schar-Zammaretti // Micron.- 2005.-Vol.36(4).-P.293-320.

159. Wang, Y. Progress in the studies of DNA-protein interactions by atomic force microscopy / Y. Wang, W. Liao, J. Cai // Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. - 2007. -Vol.24(5). -P.1172-1176.

160. Zheng, Y. Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia / Y. Zheng, J. Wen, J. Nguyen, M.A. Cachia, C. Wang, Y. Sun // Sci Rep. - 2015. - № 9;5. - P. 7613.

161. Zhengjian, Lv. Mechanism of amyloid β -protein dimerization determined using single-molecule AFM force spectroscopy / Lv Zhengjian, R. Roychaudhuri, M.M. Condrón, D. Teplow // Sci Rep.- 2013 .-Vol.3.-P.2880.

162. http://www.rusmedserv.com/files/labdiag/41_Molekuly_Adgezii.pdf

163. https://oncology-association.ru/files/new-clinical-guidelines/hronicheskij_limfocitarnyj_lejkoz.pdf

164. <https://medicalplanet.su/Patfiz/963.html> MedicalPlanet

165. <https://chem21.info/>

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

		Стр.
Рисунок 1	Определение гематологического статуса животных.	35
Рисунок 2	АСМ-сканирование агранулоцитов крови.	37
Рисунок 3	Фотометрический анализ агранулоцитов крови.	40
Рисунок 4	Схема проведения исследований.	41
Рисунок 5	Показатели, характеризующие содержание гемоглобина в крови животных (HGB и MCHC - g/L, MCH – pg, HCT - %).	45
Рисунок 6	Показатели, характеризующие эритроциты и тромбоциты в крови животных (RBC- 10^{12} , PLT- 10^{10} , MCV и MPV-fL, RDW, PDW и PCT-%).	46
Рисунок 7	Показатели, характеризующие лейкоцитарную фракцию крови животных (лимфоциты и сегментоядерные нейтрофилы - 10^{10} , СОЭ – мм/ч, остальные показатели - 10^9).	46
Рисунок 8	Биохимические показатели крови исследуемых животных.	49
Рисунок 9	Биохимические показатели крови исследуемых животных (АСТ, АЛТ и ЩФ - ЕД/л; белок общий и альбумин - г/л).	49
Рисунок 10	Дефекты АСМ сканирования (а - присутствие в мазке других клеток помимо агранулоцитов, б - деградация клеток, в - разрыхление цитолеммы, г - образование вздутий на мембране, д - кристаллы фикола на сканируемой поверхности, е - наслоение клеток друг на друга).	53
Рисунок 11	3-D проекция лимфоцитов при АСМ.	54
Рисунок 12	Измерение отдельного параметра - высоты (а) и анализ всех морфометрических параметров (б) отдельного лимфоцита	55
Рисунок 13	Измерение адгезии лимфоцита	56
Рисунок 14	Измерение силовых кривых для расчета модуля Юнга клетки	57

Рисунок 15	Морфометрические параметры лимфоцитов (диаметр и высота – μm , площадь – μm^2 , объем – μm^3)	58
Рисунок 16	Биофизические параметры лимфоцитов (адгезия – nN , модуль Юнга – Mпа , шероховатость – nm).	59
Рисунок 17	Образование осадка формазана (а), растворение его в DMSO (б).	62
Рисунок 18	Метаболическая активность интактных и инфицированных лимфоцитов с помощью МТТ – теста, $\text{нг формазана/лимфоцит}$ ($P = 0,027$)	63
Рисунок 19	Зависимость интенсивности поглощения окрашенных лимфоцитов от длины волны (а - интактные; б - BLV -инфицированные; в - BIV -инфицированные; микст-инфицированные)	66
Рисунок 20	Наслоение крови на градиент (а), взвесь лимфоцитов (б)	73
Таблица 1	Клинический анализ крови интактных и инфицированных ретровирусами животных, ($M \pm m$)	43
Таблица 2	Биохимический анализ крови интактных и инфицированных ретровирусами животных, ($M \pm m$)	47
Таблица 3	Структурно-биофизические характеристики агранулоцитов крови крупного рогатого скота с разным гематологическим статусом	57
Таблица 4	Содержание формазана в интактных и инфицированных ретровирусами лимфоцитах по результатам МТТ-теста	63
Таблица 5	Показатели поглощения лимфоцитов интактного и инфицированного крупного рогатого скота в зависимости от длины волны	66

ПРИЛОЖЕНИЯ



ДИПЛОМ

I степени

награждается

аспирант

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова

Артемьев Дмитрий Алексеевич

*за победу в номинации «Биологические науки»
на II этапе Всероссийского конкурса
на лучшую научную работу
среди студентов, аспирантов и молодых ученых
высших учебных заведений
Министерства сельского хозяйства
по Приволжскому федеральному округу*

***И.о. ректора Вятской ГСХА,
профессор***

25 апреля 2019 г.

В.Г. Мохнаткин

г. Киров



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА

ДИПЛОМ

награждается

Артемьев

Дмитрий Алексеевич

Научные руководители:

Красников А.В., Красникова Е.С., Козлов С.В.

I место

в I этапе Всероссийского конкурса научно-инновационных
работ среди студентов, аспирантов и молодых ученых университета,
направление «Биологические науки»
в номинации «Наука аспирантов и молодых ученых»

Ректор



Н.И. Кузнецов

Саратов 2019







СЕРТИФИКАТ

награждается

аспирант

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

им. Н.И. Вавилова

Артемов Дмитрий Алексеевич

за участие

во II этапе Всероссийского конкурса

на лучшую научную работу

среди студентов, аспирантов и молодых

ученых высших учебных заведений

Министерства сельского хозяйства

по Приволжскому федеральному округу

*И.о. ректора Вятской ГСХА,
профессор*

25.04.2019 г.

В.Т. Мохнаткин

г. Киров





Science & Technology City Hall

Krasnoyarsk | Russia

INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE
ICMSIT-2020: METROLOGICAL SUPPORT OF
INNOVATIVE TECHNOLOGIES

CERTIFICATE

THIS IS TO CERTIFY THAT

**D A ARTEMEV, A V KRASNIKOV, E S KRASNIKOVA, S A KALGANOV AND
E A MARKOVA**

participated in the International Scientific Conference "ICMSIT-2020: Metrological Support of Innovative Technologies" in March 4, 2020 in Saint Petersburg - Krasnoyarsk, Russia.

The research paper «**Application of a microspectral analysis for evaluation of the morphofunctional status of immunocompetent cells in cattle with retroviral diseases**» has been reviewed by the Editorial Board, accepted to the Conference Proceedings and sent to Journal of Physics: Conference Series (JPCS) for further publishing.



IGOR KOVALEV
SCIENTIFIC SUPERVISOR OF
«ICMSIT-2020»
DOCTOR OF TECHNICAL SCIENCES,
PROFESSOR



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2019 110 652** (13) **A**

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

Состояние делопроизводства: Экспертиза по существу завершена (последнее изменение статуса: 07.04.2020)

(21)(22) Заявка: [2019110652](#), 10.04.2019

(30) Конвенционный приоритет: RU

Делопроизводство

Исходящая корреспонденция		Входящая корреспонденция	
Решение о выдаче патента	03.04.2020	Дополнительные материалы	14.02.2020
Отчет об информационном поиске	26.12.2019		
Запрос экспертизы	26.12.2019		
Уведомление об удовлетворении ходатайства	03.06.2019	Ходатайство о проведении экспертизы заявки по существу	29.05.2019
Уведомление об удовлетворении ходатайства	03.06.2019	Ходатайство об освобождении от уплаты пошлин или уменьшении размера	29.05.2019
Уведомление о положительном результате формальной экспертизы	19.04.2019		
Уведомление об удовлетворении ходатайства	19.04.2019	Ходатайство об освобождении от уплаты пошлин или уменьшении размера	10.04.2019
Уведомление о зачете пошлины	19.04.2019	Платежный документ	10.04.2019
Уведомление о поступлении документов заявки	10.04.2019		