

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Саратов 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Мичуринский государственный аграрный университет»

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, доцент
Красников Александр Владимирович

Официальные оппоненты: **Крячко Оксана Васильевна**,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет
ветеринарной медицины», заведующая
кафедрой патологической физиологии
Абакин Сергей Стефанович,
кандидат ветеринарных наук, доцент,
Всероссийский научно-исследовательский
институт овцеводства и козоводства -
филиал ФГБНУ «Северо - Кавказский
Федеральный Научный Аграрный центр»,
ведущий научный сотрудник лаборатории
ветеринарной медицины

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Омский государственный
аграрный университет имени П.А.
Столыпина»

Защита состоится «__» _____ 2020 года в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК № 3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и на сайте www.sgau.ru

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1, ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

Егунова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (П.Н. Смирнов, 2017; Н.Е. Gaub, 2002).

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 изучению патогенеза и, как следствие, дифференциальной диагностике гематопатологических процессов (Y. Zheng et al., 2015; М.М. Pinheiro et al., 2017; А.Д. Meade et al., 2019).

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 (Г.Н. Бобкова и др., 2011; И.В. Виноградова и др., 2011). Учитывая биологические свойства ретровирусных инфекций, до сих пор не существует средств специфической терапии, профилактики или коррекции этих болезней, кроме как возможности прерывания эпизоотического процесса через выбраковку животных (P.Y. Varez et al., 2015; А. Abdala et al., 2019). 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 (Б.Т. Стрегний и др., 2013). 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 (В.И. Околелов и др., 1999; Г.Н. Бобкова и др., 2011; Т.В. Гуськова и др., 2017; В.С. Власенко и др., 2017).

Согласно последним исследованиям, ригидность агранулоцитов (лимфоцитов) крови претерпевает значительные изменения в процессе гиперпластических заболеваний (Г.Н. Бобкова и др., 2011; Т.В. Гуськова и др., 2017). 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 (Г.Н. Бобкова и др., 2011; М.Б. Ребезов и др., 2016; Т.В. Гуськова и др., 2017).

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 (С.С. Абакин и др., 2011; О.В. Иванов и др., 2015; Ю.П. Смирнов и др., 2017; Е.С. Красникова и др., 2018; J.C. Hsieh et al., 2019).

Отдельные, в основном зарубежные, исследователи занимаются вопросами изучения механизма взаимодействия ретровирусов с различными структурами клетки - носителя (G. Arriagada, 2017; A.M. Passos-Castilho et al., 2018). 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 4,5 п.л., из них 2,3 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 и 13 приложениями. Список литературы представлен 165 источниками, из них 61 зарубежные.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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.»).

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 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 № 2615465). Синтез праймеров осуществляли в ЗАО «Синтол» (Россия). Для постановки реакции и ее учета использовали набор ПЦР-Микс с буфером для нанесения (НПФ «Литех», Россия). Амплификация проводилась в термоциклере T100, а детекция ампликонов - на оборудовании GelDoc XR (BioRad, США). Учет реакции проводили методом горизонтального электрофореза с применением набора «ЭФ» (ИЛС, Россия).

Исследования морфологического состава крови осуществляли на гематологическом анализаторе MicroCC20Vet Auto Hematology Analyzer (НТИ, USA), при этом подсчет лейкоцитарной формулы производился вручную с помощью счетчика лейкоцитарной формулы СЛФ-ЭЦ-01-09 (Россия). 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.

На биохимическом анализаторе полуавтоматического типа BioChemSA (USA) с применением реагентов линейки Диакон-ДС (Россия) определяли биохимические параметры крови исследуемых животных.

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

Для измерения морфо-биофизических параметров клеток использовали сканирующий атомно-силовой микроскоп фирмы «NT-MDT» модель Solver P47 PRO (Зеленоград, Россия). Вычислялись средние значения МЮ каждого из исследованных пяти серий биологических образцов. Полученные средние значения МЮ лимфоцитов распределялись с шагом в 0,4 КПа. С помощью программного обеспечения «Debug Nova_1.1.0.1847», измеряли диаметр, высоту, объем, шероховатость и адгезию лимфоцитов крупного рогатого скота, оценивалась их форма.

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 шейкированием, 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. По построенному калибровочному графику определяли концентрацию формазана в мкг/мл раствора.

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. 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 ($I\lambda$) в видимой области спектра при спектральной ширине ($\delta\lambda$) 350 - 700 нм.

Статистическую обработку данных осуществляли в программном обеспечении «Statistica 8.0» путем определения средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m), отличия между группами считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$.

Научно исследовательская работа выполнялась в соответствии с нижеуказанной схемой (рис. 1.):



Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Результаты исследований и их обсуждение

Гематологический статус исследуемых животных, как индикатор адаптивного иммунитета

Результаты исследования гематологического статуса животных представлены в таблицах 1 и 2.

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

Показатели	Интактные животные	BLV-инфицированные	BIV-инфицированные	BLV/BIV-инфицированные	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
Тромбокрит (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 ≤ 0,05 при t критическом 2,10)

Как следует из данных, представленных в таблице 1, морфологические параметры периферической крови интактных животных были в пределах физиологической нормы, а 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. 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. 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 увеличивалась во всех экспериментальных группах, при том, что эти показатели находились в допустимых пределах.

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 объема тромбоцита в 1,2-2,8 раз. 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. 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.

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

Показатели	Интактные животные	<i>BLV</i> -инфицированные	<i>BIV</i> -инфицированные	<i>BLV/BIV</i> -инфицированные	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, 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, АСТ и АЛТ 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 с интактным 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.

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

АСМ - сканирование показало достоверные изменения морфометрических и биофизических параметров лимфоцитов интактных и инфицированных ретровирусами животных (таб. 3).

Полученные нами данные свидетельствуют, что лимфоциты интактного крупного рогатого скота имели диаметр около 9 мкм, у *BLV*-инфицированного, и при *BIV-BLV*-инфекции диаметр уменьшался, на 18,5% и 22,7%. Высота исследуемых клеток при *BLV*, и *BIV-BLV* инфекции была меньше на 9% и 25%, в сравнении с клетками интактных животных. Данная тенденция характерна для площади и объема клеток, эти характеристики уменьшились на 36% / 49,5% и 4,4% / 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 интактных животных.

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

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

Модуль упругости лимфоцитов при *BIV*-инфекции уменьшался значительно в сравнение с другими экспериментальными группами – на 35,8%, при *BLV*-инфекции на 33,8%, а *BIV-BLV*-инфекции на 33,1%. Шероховатость *BLV*-, *BIV*- и микст-инфицированных лимфоцитов повышалась на 37,3%, 19,2% и 14,8%, соответственно, при сравнении с шероховатостью интактных клеток. Их адгезивные свойства повышались в 2,3; 3,4 и 3,0 раза соответственно, в сравнении с интактными.

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

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 наших исследований, представленные в таблице 4, 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*- и *BLV/BIV*-инфицированных коров была в 1,4; 3,8 и 7,4 раза меньше, чем у интактных.

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

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	$31,3 \pm 1,5$	$50,1 \pm 2,6^{* \#}$	$35,5 \pm 1,7$	$33,3 \pm 1,6$
400	$97,5 \pm 4,9$	$110,3 \pm 5,6$	$110,7 \pm 5,5$	$73,3 \pm 3,7^{* \#}$
450	$195,4 \pm 9,8$	$310,4 \pm 15,5^{* \#}$	$286,9 \pm 14,3^{* \#}$	$115,2 \pm 5,8^{* \#}$
500	$210,3 \pm 10,5$	$371,5 \pm 18,5^{*}$	$351,2 \pm 17,2^{*}$	$253,3 \pm 12,7^{* \#}$
550	$98,7 \pm 4,9$	$146,6 \pm 7,3^{*}$	$175,5 \pm 8,8^{* \#}$	$150,7 \pm 7,5^{*}$
600	$93,5 \pm 4,6$	$189,1 \pm 9,5^{*}$	$188,3 \pm 9,4^{*}$	$148,3 \pm 4,7^{* \#}$
650	$173,6 \pm 8,6$	$500,2 \pm 24,9^{* \#}$	$751,4 \pm 37,6^{* \#}$	$383,3 \pm 19,2^{* \#}$
700	$156,2 \pm 7,8$	$461,6 \pm 23,1^{* \#}$	$725,2 \pm 36,3^{* \#}$	$345,4 \pm 17,3^{* \#}$
750	$34,4 \pm 1,7$	$50,3 \pm 2,6^{*}$	$99,6 \pm 4,9^{* \#}$	$51,1 \pm 2,6^{*}$

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

Данные, представленные в таблице 5 свидетельствуют о том, что у лимфоцитов коров с сочетанной патологией (*BLV/BIV*) значения поглощения (I_{λ}) в спектре эозина У и азура II составили $351,2 \pm 17,6$ и $751,4 \pm 37,6$ counts соответственно. Для животных с *BLV* и *BIV* моноинфекцией эти показатели были на уровне $253,3 \pm 12,7$; $383,3 \pm 19,2$ и $371,5 \pm 18,5$; $500,2 \pm 24,9$ counts соответственно. В то время как у интактных коров они регистрировались в пределах $210,3 \pm 10,5$ и $173,6 \pm 8,6$ counts.

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.

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, свободную от фикола и сывороточных белков.

Кровь крупного рогатого скота обладает рядом принципиальных в нашем случае особенностей: преобладанием лимфоцитов над гранулоцитами; очень низкой скоростью оседания эритроцитов; относительно большим содержанием тромбоцитов. 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.

В связи с этим нами был разработан и запатентован способ выделения лимфоцитов, который может с успехом использоваться в ветеринарной медицине (Решение о выдаче патента от 03.04.2020 по заявке 2019110642 от 10.04.2019). 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

Изучение показателей, характеризующих состояние клеточных и гуморальных факторов врожденного и адаптивного иммунитета у животных в норме и при патологии, является одним из приоритетных направлений ветеринарной медицины, так как позволяет успешно прогнозировать ситуацию и активно управлять ею, учитывая весь комплекс факторов и их взаимосвязанность (Р.М. Хоменко и др., 2018; О.В. Крячко, 2017). Особенно актуально это при изучении специфически обусловленных повреждений иммунной системы, механизм развития которых детерминирован природой их возникновения.

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.

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 степенью злокачественности онкопатологии.

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.

Таким образом, полученные нами результаты исследований позволяют заключить, что:

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 снижались, а при *BIV*-инфекции, напротив, повышались по сравнению с клетками крови интактных животных.

5. Активность НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктаз лимфоцитов крови инфицированных ретровирусами коров снижалась, 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **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.

2. **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.

3. **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.

4. **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. – №5. – С.

Статьи, индексируемые в Scopus / Web of Science

5. **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. – С. 107160G.

6. 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. – 2019. – No 1399. – P. 022013.

7. **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.

Патенты

8. 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.

Публикации в других изданиях

9. **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.

10. **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. – С. 14 - 15.

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

12. **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. – С. 33 - 44.

13. 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>.

14. 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>.