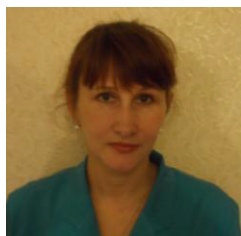
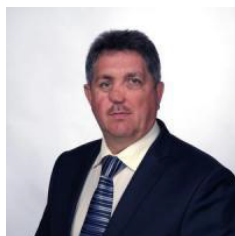


УДК:619:616-006:616-097.08

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРЕФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У
МЫШЕЙ BALB/c ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛЕЙКОЗА
РАУШЕРА И ОДНОВРЕМЕННОМ ДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТА «СУБАЛИН»**



Я.Л. Русакова



С.Н. Магер*



В.В. Храмцов**

НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, г.Новосибирск

*Новосибирский государственный аграрный университет, г.Новосибирск

**Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока

E- mail: Yarojana@mail.ru

Ключевые слова: гематологические; морфологические; иммунологические изменения; экспериментальный лейкоз Раушера; субалин.

Показаны морфологические изменения, происходящие в периферической крови под воздействием препарата субалин на экспериментальной модели мышей линии BALB/c, инфицированных вирусом лейкоза Раушера (ВЛР). Вирус лейкоза Раушера вызывает 100% гибель животных. Введение препарата субалин не продлило срок жизни зараженным животным и не снизило их смертность. ВЛР вызывает нарастающую эритропению и лейкопению в гиперпластический период заболевания. В терминальной стадии лейкоза количество лейкоцитов у зараженных животных восстанавливается. Лейкограмма инфицированных мышей характеризуется увеличением дегенеративного сдвига влево, эозинофилией и моноцитозом. Под действием субалина происходит выравнивание гематологических показателей и лейкопоза зараженных ВЛР мышей. Применение препарата Субалин у мышей, инфицированных ВЛР, приводит к стабилизации гематологических показателей и лейкопоза. В терминальный период под действием субалина у зараженных мышей наблюдается увеличение количества метамиелоцитов.

**MORPHOLOGICAL CHANGES OF PERIPHERAL BLOOD OF BALB/c MICE WITH
EXPERIMENTAL RAUCHER LEUKEMIA DEVELOPMENT AND SIMULTANEOUS
EFFECT OF THE DRUG SUBALIN**

Y.L. Rusakova, S.N. Mager*, V.V. Khramtsov**

The Novosibirsk E.N. Meshalkin Blood Circulation Pathology Research Institute of the
Ministry of Health of the Russian Federation

*Novosibirsk State Agrarian University

**Institute of Experimental Veterinary in Siberia and Far East

Keywords: haematological, morphological, immunological changes, Rauscher experimental leukemia, subalin.

Инновационное развитие АПК Innovative development of the agroindustrial complex

Were demonstrated morphological changes, that happen in peripheral blood under effect of the drug Subalin in trial group of BALB/c mice, infected by a Rauscher leukemia virus (RLV). The RLV causes the death of 100% of the animals. The introduction of the drug Subalin did not prolong lifespan of the contaminated animals and their death rate did not reduce. The RLV generates an increasing erythropenia and leukopenia in the hyperplastic period of disease. The amount of leucocytes of contaminated animals restores during the terminal stage of leukosis. The leukogram of the infected mice is characterized by intensification of the degenerative left shift, eosinophilia and monocytosis. Under effect of the Subalin occurs the leveling of hematological indexes and leukopoiesis of the RLV-infected mice. The use of the drug Subalin among mice infected with RLV, results in stabilization of hematological indexes and leukopoiesis. Increase in amount of metamyelocytes is observed in the terminal period among the infected mice.

В настоящее время во многих экспериментальных и клинических исследованиях активно изучаются морфофункциональные изменения органов иммунной системы при лечении лейкоза человека и животных. В том числе большое внимание уделяется изучению гематологических изменений [1,2]. Изучен механизм вирусного лейкозогенеза [3,4]. Исследованы отличия спектров поверхностных антигенов стволовых клеток эритролейкоза от нормальных стволовых клеток крови [5]. Разрабатываются иммуноферментная и молекулярно-биологическая диагностика [6,8]. С 70-х годов прошлого века рассматриваются возможности применения вакцинации, нативного интерферона и других препаратов для профилактики и лечения лейкозов [8-12]. Известно, что интерфероны защищают клетки от вирусной инфекции, подавляя внутриклеточную репликацию ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Группой украинских ученых разработан препарат субалин (группа пробиотиков). Доказана его высокая активность в отношении многих патогенных вирусов [14-16].

Актуальность и научная новизна нашей работы обусловлена тем, что в доступной нам научной литературе не обнаружено сведений по динамике морфологических изменений крови экспериментальных животных при длительном течении вирусного лейкоза Раушера и при воздействии препаратом субалин на инфицированных мышей.

Ранее в своих публикациях мы показывали динамику различий гематологических показателей, изменений структуры и цитоархитектоники подвздошного лимфатического узла мышей, инфицированных ВЛР [16].

Целью настоящей работы было изучить гематологические изменения у мышей восприимчивой линии (BALB/c) при применении препарата субалин в гиперпластическом и в терминальном периоде заболевания.

Материалы и методы исследований. Для исследования в качестве экспериментальных животных использовали мышей BALB/c (по 20 в каждой группе), самки с исходной массой тела 18-22г. Работа выполнялась на базе лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ ННИИПК им. ак. Е.Н.Мешалкина, лаборатории лейкозов ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии и кафедре хирургии и внутренних незаразных болезней ФГБОУ ВПО НГАУ. Все исследования проводились согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» [7] и стандартным операционным процедурам лаборатории. Условия содержания соответствовали стандартам, указанным в руководстве The Guide for Care and Use of Laboratory Animals [23]. Животные содержались в поликарбонатных клетках на подстилке из древесной стружки, получали стандартный гранулированный корм (Прокорм для лабораторных животных крыс и мышей, производитель БиоПро, Россия) и профильтрованную водопроводную воду.

Животных разделили на группы: группа антиген (АГ), группа субалин (Суб), группа антиген+субалин (АГ+Суб) и группа контроля (ЗД). Животным экспериментальных групп

Инновационное развитие АПК

Innovative development of the agroindustrial complex

введение соответствующего биоматериала выполнялось одновременно, путем внутрибрюшинной инъекции.

В группе антиген (АГ), животные заражались вирусом лейкоза Раушера. Для экспериментального воспроизведения инфекции вируса Раушера брали селезенку массой 200 мг, суспендировали с 200 мкл физиологического раствора, центрифугировали при 1000 об/мин, собирали надосадок, доводили до начального объема 200 мкл, и разводили в 100 мл физиологического раствора. Для заражения 1 животного брали 0,1 мл надосадочной жидкости (1/1000 часть селезенки).

В группе субалин (Суб) каждому животному вводили препарат субалин в количестве 1,5 дозы (доза отработана в предварительных опытах). В группе антиген+субалин (АГ+Суб), кроме АГ в указанной дозировке (1/1000 часть селезенки) каждому животному вводили препарат субалин в количестве 1,5 дозы. Контролем служила группа здоровых животных (ЗД), которым вводили физиологический раствор в объеме 0,5 мл.

Забор крови проводили в утренние часы по методике, разработанной авторами Nemas A., Smith A.J., Solberg P., сотрудниками Forsoksdyrveterinar-tjeneste Laboratory Animal Veterinary Services Vivarium Universitet, Bergen в 1998г, а у нас описанной Степеновой О.И. [26]. В крови определяли абсолютное количество эритроцитов, лейкоцитов в камере Горяева, проводили подсчет лейкоцитарной формулы стандартными лабораторными методами [27]. Статистическую обработку полученных данных проводили методом подсчета средних арифметических (M), стандартных ошибок (m). В таблицах информация представлена в виде $M \pm m$. Уровень значимости различий вариационных рядов оценивали параметрическим t -критерием Стьюдента.

Результаты собственных исследований и их обсуждение. В большинстве исследований, описанных в литературе, зараженные мыши погибали спустя 4 - 6 недель после инфекции, обычно из-за разрыва чрезвычайно увеличенной селезенки [28-30]. В нашем эксперименте мыши, зараженные вирусом Раушера, гибли постепенно в течение 11 месяцев наблюдения, начиная с 25 дня после заражения. Контрольные исследования крови проводили 1 раз в месяц.

Животные, зараженные вирусом, гибли постепенно в течение всего периода наблюдения, начиная с 25-го дня после заражения (Рис.1). Причем 25% животных погибло в течение первых 3-х месяцев, с 3 по 7 месяцы, погибло всего 10% животных; с 7 по 10 месяцы наблюдения летальность ежемесячно составляла 5-15%; с 10 по 11 месяц погибло 35% животных. Таким образом, к 11-му месяцу наблюдения все опытные животные АГ погибли.

В группе Суб за первые 3 месяца наблюдения погибло 35% животных. Оставшиеся 65% животных группы оставались стабильны на протяжении следующих 8 месяцев. В группе АГ+Суб за первые 3 месяца наблюдения погибло 65% животных, причем большая часть в период от 1 до 1,5 месяцев (40%). В последующем, каждый месяц гибли примерно по 10% животных так, что к 8 месяцу наблюдения погибли все животные группы.

Динамика изменений гематологических показателей отражена в таблице 1. После инфицирования вирусом Раушера мы наблюдали достоверное уменьшение количества эритроцитов в группе АГ по сравнению с контрольной группой (ЗД) через 2 месяца в 1,86 раз и через 11 месяцев наблюдения в 2,49 раз. Кроме того, в терминальную стадию (11 месяцев) у животных группы АГ по сравнению с показателями в 2 месяца после заражения обнаружено достоверное уменьшение количества эритроцитов.

Инновационное развитие АПК Innovative development of the agroindustrial complex

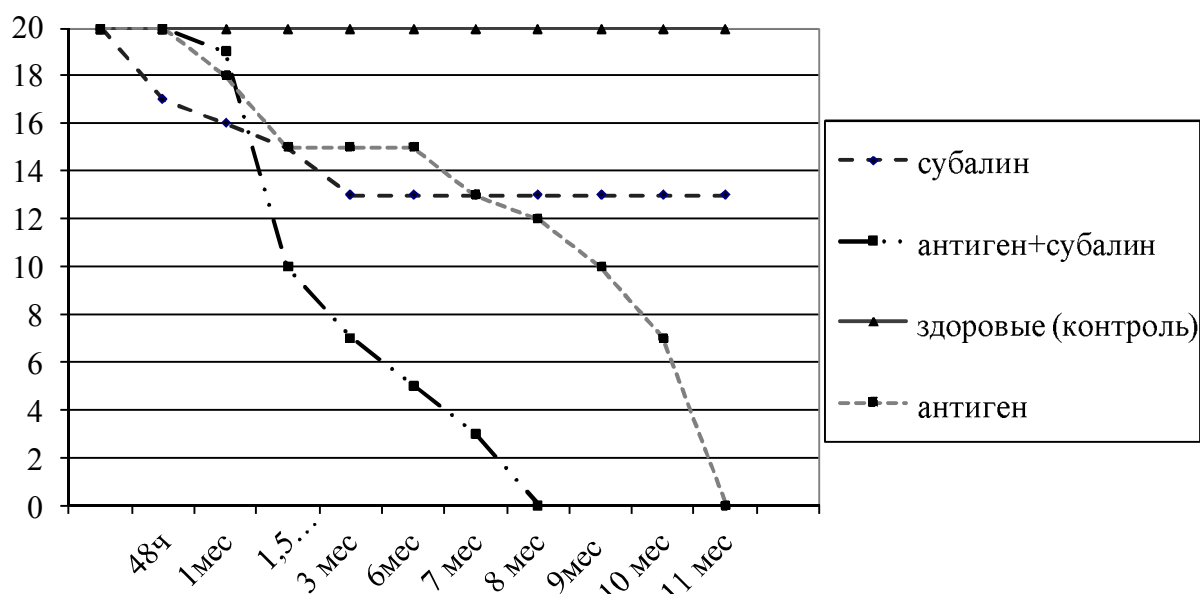


Рисунок 1. Динамика летальности мышей опытных групп.

-ось ординат – количество животных в группе,

-ось абсцисс – время наблюдения.

Таблица 1

Динамика гематологических показателей опытных и контрольной групп животных, ($M \pm m$), $n=9$

Группа животных	эритроциты		лейкоциты	
	2 мес	8-11 мес	2 мес	8-11 мес
АГ	$5,39 \times 10^6 \pm 0,43$ *	$3,73 \times 10^6 \pm 0,15$ ** Δ	$4,19 \times 10^3 \pm 0,68$ *	$5,12 \times 10^3 \pm 0,74$
Субалин	$10,26 \times 10^6 \pm 0,94$	$9,5 \times 10^6 \pm 0,23$	$8,82 \times 10^3 \pm 1,29$	$10,51 \times 10^3 \pm 1,32$
АГ+Субалин	$6,56 \times 10^6 \pm 1,17$ *	$6,09 \times 10^6 \pm 0,76$ ** $\Delta\Delta\bullet\bullet$	$5,21 \times 10^3 \pm 0,68$	$8,18 \times 10^3 \pm 1,99$
ЗД(контроль)	$10,03 \times 10^6 \pm 0,4$	$9,29 \times 10^6 \pm 0,35$	$8,17 \times 10^3 \pm 1,2$	$7,78 \times 10^3 \pm 0,94$

Примечание. Здесь и далее: *разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными контрольной группы через 2 месяца наблюдения; ** разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными контрольной группы через 8-11 месяцев наблюдения; Δ разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными опытной группы (АГ) через 2 месяца наблюдения; $\Delta\Delta$ разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными опытной группы (АГ) через 8-11 месяцев наблюдения; $\bullet\bullet$ разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными опытной группы (Суб) через 8 месяцев наблюдения.

Количество эритроцитов в группе Суб не имело достоверных отличий от контрольных значений.

В группе АГ+Суб наблюдалось достоверное уменьшение количества эритроцитов (в 1,5 раза) по сравнению с контролем как в гиперпластическом, так и в терминальном периоде. В то же время, в терминальном периоде болезни количество эритроцитов в группе АГ+Суб оставалось достоверно выше, чем в группе АГ.

Количество лейкоцитов в группе АГ через 2 месяца уменьшилось в 1,95 раз по сравнению с контролем. Через 11 месяцев количество лейкоцитов в группе АГ увеличилось,

Инновационное развитие АПК Innovative development of the agroindustrial complex

и разница с контрольными значениями перестала быть достоверной. Изменения количества лейкоцитов в группе Суб и АГ+Суб не имело достоверных отличий.

В лейкограмме животных **группы АГ через 2 месяца** появились юные клетки, что свидетельствует об интенсивном пролиферативном процессе в организме мышей (таблица 2). Количество нейтрофилов увеличилось в 2 раза по сравнению с контролем, при этом отмечался дегенеративный сдвиг влево (индекс сдвига 0,3), а количество лимфоцитов уменьшилось в 2,2 раза по сравнению с контрольными значениями. Через 11 месяцев количество юных клеток уменьшилось до 0,78%. Отмечалась нейтропения, дегенеративный сдвиг увеличился до 1,3, при этом мы наблюдали лимфоцитопению, моноцитоз и эозинофилию.

В группе Субалин через 2 месяца наблюдалось увеличение количества моноцитов по сравнению с контролем в 1,7 раз. Другие показатели лейкограммы оставались близки к контрольным значениям на протяжении всего периода наблюдения.

В группе АГ+Суб через 2 месяца отмечалось достоверное увеличение количества эозинофилов до $1,0 \pm 0,01$, что в 2,3 раза больше контрольных значений; в 3 раза больше по сравнению с группой АГ и в 1,6 раз больше по сравнению с группой Суб. В терминальной стадии их количество приблизилось к контрольным значениям. Юные клетки появились в группе АГ+Суб, как и в группе АГ, на 2-м месяце наблюдения. К 8-му месяцу эксперимента их количество увеличилось в 2,1 раза. Количество палочкоядерных нейтрофилов также было увеличено по сравнению с контролем в 15,2 раза на 2-м месяце наблюдения и в 18,5 раз в терминальной стадии; (по сравнению с группой АГ количество палочкоядерных нейтрофилов оставалось сниженным в 2,9 и в 2,1 раз в ранний и поздний период соответственно). Количество сегментоядерных нейтрофилов было достоверно снижено по отношению к контрольной группе в среднем в 3,3 раза. При сравнении с группой АГ в гиперпластическом периоде отмечалось уменьшение количества сегментоядерных нейтрофилов в 5 раз. Их количество оставалось примерно одинаковым на протяжении всего периода исследования. Кроме того, наблюдался лимфоцитоз и моноцитоз.

Выводы

1. Инфицирование вирусом лейкоза Раушера мышей BALB/c вызвало 100% смертность животных. Введение животным препарата Субалин не снизило летальность инфицированных ВЛР мышей и не продлило срок их жизни.

2. Инфицирование ВЛР мышей BALB/c вызывает изменения гематологических показателей периферической крови, выраженные нарастающей эритропенией и снижением количества лейкоцитов через два месяца и нормализацией их к 11-му месяцу наблюдения. В лейкограмме отмечалось увеличение дегенеративного сдвига влево, эозинофилия и моноцитоз.

3. Введение животным Субалина не повлияло на динамику гематологических показателей. В тоже время Субалин оказал значительное влияние на выравнивание гематологических показателей и лейкопоза, животных инфицированных вирусом лейкоза Раушера. В группе АГ+Суб изменения крови мышей сходны с группой АГ, но менее выражены, при этом значительно увеличилось количество юных клеток в лейкограмме (в 4 раза больше, чем в группе АГ) в терминальном периоде.

Инновационное развитие АПК
Innovative development of the agroindustrial complex

Таблица 2

Динамика показателей лейкограммы крови животных опытных и контрольной групп мышей BALB/c, (M±m)

Показатели лейкограммы		АГ(n=9)		Суб (n=9)		АГ+Суб(n=9)		ЗД(n=9) (контроль)	
		2 мес	8-11 мес	2 мес	8-11 мес	2 мес	8 мес	2 мес	8-11 мес
базофилы		0,11±0,11	0,11±0,11	-	-	0,11±0,11	0,11±0,11	-	-
эозинофилы		0,33±0,17	15,0±0,5 **	0,62±0,09	0,73±0,15	1,0±0,01 *Δ●	0,52±0,19 ΔΔ	0,44±0,24	0,44±0,29
нейтрофилы	юные	1,22±0,23 *	0,78±0,52 **	-	-	1,50±0,14	3,14±0,05 ΔΔ	-	-
	палочкоядерные	14,67±0,42 *	16,93±1,21 **Δ	0,54±0,09	0,30±0,09	5,02±1,0 Δ*●	8,15±2,04 **ΔΔ●●	0,33±0,18	0,44±0,24
	сегментоядерные	54,0±2,99 *	14,11±1,87 Δ**	32,14±2,40	37,90±3,0	11,03±2,25 *Δ●	12,08±2,08 **●●	35,89±3,22	39,0±2,27
лимфоциты		28,78±2,90 *	39,78±2,04 **	65,14±2,96	60,03±3,12	76,2±2,44 *Δ●	72,55±2,95 **ΔΔ●●	62,67±3,38	59,11±2,16
моноциты		0,89±0,26	13,29±0,71 **Δ	1,55±0,13 *	0,95±0,09	5,14±0,22 *Δ●	2,72±0,43 **ΔΔ●●	0,67±0,24	1,0±0,17

Библиографический список

1. Амиров С.Х. Гематологический профиль крупного рогатого скота неблагополучных по лейкозу стад/ С.Х. Амиров // Труды ВИЭВ.- М., 1991. -Т. 70. –С.34-38.
2. Женихова Н.И. Вирусная лейкемия кошек/ Н.И. Женихова, С.С. Перекрасова// Ветеринарный доктор.-2009.- №5.-С.6-8.
3. Gabrilovich D. I. Murine retrovirus induces defects in the function of dendritic cells at early stages of infection/ D. I.Gabrilovich, S.Patterson, J.J. Harvey, G. M.Woods, W.Elsley, C.Knight // Cell.Immunol.-1994.-№158.-P.167–181.
4. Naniche D. Generalized immunosuppression: how viruses undermine the immune response/ D. Naniche, M. Oldstone // CMLS, Cell. Mol. Life Sci.-2000.-№57.-P.1399–1407.
5. Мечетнер Е.Б. Свойства и идентификация клоногенных клеток лейкоза Раушера/ Е.Б.Мечетнер, Е.С.Иевлева, Э.Н.Розинова, И.С.Ирлин, М.А. Чижевская// Пробл. Гематологии.- 1979.-Т. 9.- С. 51-59.
6. Методические рекомендации по определению антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа/Сост. Шишков В.П., Бурба Л.Г., Иванова Л.А.-ВНИИЭВ им. Я.Р.Коваленко.- Москва, 1983.-10с.
7. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики Российской Федерации».
8. Рассулин Ю.Ю. Обнаружение провируса лейкоза крупного рогатого скота в лейкоцитах периферической крови крупного рогатого скота методом ДНК гибридизации/ Ю.Ю. Рассулин, Н.А. Федорова, В.О. Речинский, М.И. Парфанович // Вопр. вирусологии.-1988.- №1.- С.58-63.
9. Альтштейн А.Д. Подходы к живой вакцине против бычьего лейкоза на основе вируса осповакцины/А.Д.Альтштейн, А.Ф. Велихов// Сборник материалов научно-практических конференций: Тез. докл. 5-й Всерос. конф. «Новые направления биотехнологии», 18-22 мая 1992.-М.: Пушкино.-С.52.
10. Магер С.Н. Биологическая характеристика потомства здоровых и больных лейкозом коров, и ассоциативное развитие лейкоза и туберкулеза у животных: автореф. дисс. ...докт. биол. Наук/ С.Н.Магер.- Новосибирск, 2006. – 40с.
11. Мазуренко Н.П. Вакцинация мышей против некоторых вирусов лейкозов/ Н.П. Мазуренко, Е.С. Ревазова.- Рига.- 1970.-С.421-428.
12. Miller J. Bovine leukemia virus vaccine/ J.Miller // Anim. Models of Retrov. Inf. and their Relationship to AIDS.-1987.-P.421-430.
13. Portetelle D. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leucosis virus env gene / D. Portetelle, K. Limback, A. Burny // Vaccine.-1990- №9.-P. 194-200.
14. Белявская В.А. Биологические эффекты интерферона, продуцируемого рекомбинантными бактериями препарата - пробиотика субалина/ В.А.Белявская, Н.В.Чердынцева, В.М.Бондаренко и др.// Журн. микробиол.-2003.-№2.-С.102-109.
15. Грачев А.Ю.Экспериментальная оценка влияния аэрогенного хронического поступления *B. subtilis* на некоторые показатели иммунитета/ А.Ю. Грачев, С.А. Адов, А.Н. Васильев // Мат. юбил. науч. конф., посв. 50-летию Центра ВТП БЗ НИИ микробиологии МО РФ.- Екатеринбург.-1999.- С. 50-51.
16. Сорокулова И.Б., Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования для медицины и ветеринарии/ И.Б. Сорокулова, В.А. Белявская, Масычева В.И. и др. //Вестн. РАМН. 1997.№3.С.46-49.
- 17.Русакова Я.Л. Влияние вируса лейкоза Раушера на гематологические показатели и морфологию лимфатических узлов экспериментальных мышей линии BALB/c/Я.Л.Русакова, С.Н. Магер, В.В. Храмов // Вестник НГАУ.- 2014.- №3(32).- С.104-109.

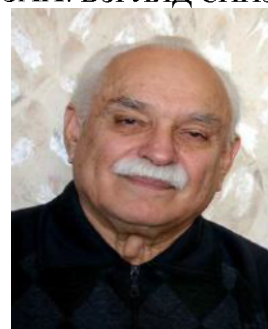
18. Степенова О.И. Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей/О.И.Степенова//Биомедицина.-2006.- №2.-С.137-139.
19. Лабораторные методы исследования в клинике/ Справочник под ред. В. В. Меньшикова.- М.- 1987.- С. 310–311.
20. Morse B. Erythrokinetics and ferrokinetics of a viral-induced murine erythroblastosis /B. Morse, D.Giuliani, T.Fredrickson, J.LoBue//Blood.-1978 Apr;51(4).-P.623-32.
21. Naniche D. Generalized immunosuppression: how viruses undermine the immune response/ D. Naniche, M. Oldstone // CMLS, Cell. Mol. Life Sci.- 2000.-57 .-P.1399–1407.
22. Sokolov P.P. A peculiarity in the humoral immunity of BALB/C mice with Rauscher leukemia/ P.P. Sokolov, V.M. Bergol'ts// BiullEkspBiol Med.- 1976.- Mar; 81(3).-P356-358.
- 23.The Guide for Care and Use of Laboratory Animals.-LAR publication, National Academy Press,1996

УДК 378

О ПОДГОТОВКЕ КАДРОВ В АГРАРНЫХ ВУЗАХ: ВЗГЛЯД СНИЗУ



¹П.Н. Смирнов, *доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации*



²С.И. Джупина, *доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный ветеринарный врач Российской Федерации*

¹Новосибирский государственный аграрный университет;

²Российский университет дружбы народов

Ключевые слова: система подготовки кадров, мотивация, земский врач, высокообразованный фермер

Анализируются причины отсутствия мотивации у студентов на получение образования по специальности. Предлагается изменить систему подготовки кадров для АПК, обеспечить более глубокую и конкретную специализацию. Уделено внимание роли старшего поколения учёных и педагогов.

ABOUT TRAINING IN AGRICULTURAL UNIVERSITIES: view from below

¹P.N. Smirnov, *Doctor of Veterinary Science, Professor, Honored Scientist of the RF*

²S.I. Dzupina, *Doctor of Veterinary Science, Professor, Honored veterinarian of the RF*

¹Novosibirsky State Agrarian University; ²Russian Peoples' Friendship University

Key words: system of training, motivation, zemstvo doctor, highly educated farmer.

Summary: *Analyzes the reasons for the lack of motivation among students to receive education in the specialty. It is proposed to change the system of training for agriculture, to provide more in-depth and specific specialization. Emphasizes the role of the older generation of scientists and teachers.*