

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КРЫС ЛИНИИ WISTAR ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ BLV

А.В. Красников, доктор ветеринарных наук, доцент

А.С. Белякова, аспирант

Е.С. Красникова, доктор ветеринарных наук, доцент

Мичуринский государственный аграрный университет

E-mail: krasnikovaes77@yandex.ru

Ключевые слова: энзоотический лейкоз, крысы линии Wistar, внутрибрюшинное заражение, общий анализ крови, анемия, нейтропения, лимфолейкоз.

Реферат. Гематологические исследования крыс линии Wistar при внутрибрюшинном заражении их лимфоцитами BLV-инфицированных коров выявили маркеры, характерные для лейкозного процесса, индуцированного возбудителем энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. У 75 % экспериментальных животных были обнаружены лимфолейкоз и нейтропения. Количество лимфоцитов в крови крыс опытной группы было на 17–36 % больше, чем у животных контрольной группы, лейкоцитов – в среднем на 30 %. У животных опытной группы присутствовали признаки эритроцитарной аплазии, гемолитической или апластической анемии. У отдельных крыс отмечали маркеры аллергии. Это позволяет нам рекомендовать внутрибрюшинный способ заражения лабораторных крыс взвесью лимфоцитов инфицированного скота для быстрого и информативного воспроизведения экспериментальной BLV-инфекции.

DYNAMICS OF BLOOD MORPHOLOGICAL INDICATORS OF WISTAR LINE RATS UNDER PARENTERAL BLV INFECTION

A.V. Krasnikov, Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor

A.S. Belyakova, Graduate Student

E.S. Krasnikova, Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor

Michurinsk State Agrarian University

Keywords: enzootic leukemia, Wistar line rats, intraperitoneal infection, clinical blood analysis, anemia, neutropenia, lymphocytic leukemia.

Abstract. Hematological studies of Wistar rats with intraperitoneal infection of their lymphocytes from BLV-infected cows revealed markers characteristic of the leukemic process induced by the pathogen enzootic leukemia in cattle. In 75% of experimental animals, lymphocytic leukemia and neutropenia were detected. The number of lymphocytes in the blood of rats of the experimental group was 17-36 % more than in the control group, leukocytes in average by 30 %. The animals of the experimental group showed signs of erythrocyte aplasia, hemolytic or aplastic anemia. Allergy markers were observed in individual rats. This allows us to recommend an intraperitoneal method of infecting laboratory rats with suspended lymphocytes from infected livestock for rapid and informative reproduction of experimental BLV infection.

Bovine leukemia virus (BLV) относится к онкогенным представителям семейства Retroviridae и является возбудителем энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) – широко распространенного во всем мире инфекционного лимфопролиферативного заболевания, которое, по данным М. Polat et al. [1], в ряде стран охватывает более 80 % восприимчивого поголовья.

Установлено, что заражение ЭЛ КРС происходит чаще всего не вирусом, а инфицированным лимфоцитом, геном которого содержит интегрированную в хромосому провирусную ДНК [2].

В последние годы появляется все больше сообщений об увеличивающемся генетическом разнообразии BLV, его способности расширять спектр своего тропизма *in vivo* [3]. В частности, в работах G.C. Vuehring et al. [4–6] представлены доказательства того, что BLV может быть связан с развитием рака молочной железы у женщин. По этой причине актуальной является задача изучения патогенеза при BLV-инфекции в гетерологичных восприимчивых к вирусу организмах.

По некоторым данным, инфекцию BLV можно воспроизвести на нескольких видах домашних и лабораторных животных [7]. K. Boris-Lawrie et al. [8] было показано, что вирус-продуцирующие клетки и провирусная ДНК являются инфекционными и иммуногенными для лабораторных крыс.

Крысы зарекомендовали себя в качестве оптимальной лабораторной модели при осуществлении широкого ряда экспериментов, так как позволяют в кратчайшие сроки с минимальными затратами выполнить многопараметрический анализ на нескольких генерациях животных. В своих предварительных исследованиях мы показали возможность моделирования BLV-инфекции на лабораторных крысах линии Wistar путем перорального заражения их молоком больных и инфицированных ЭЛ КРС коров [9, 10].

Целью настоящего исследования явился анализ динамики морфологических показателей крови крыс линии Wistar при парентеральном заражении их лимфоцитами BLV-инфицированных коров.

Объектом исследования послужили 6-месячные крысы линии Wistar (n=20), которым двукратно с интервалом в 1 неделю внутрибрюшинно вводили стерильную фракцию лимфоцитов BLV-инфицированных коров, разведенную стерильным физиологическим раствором по стандарту мутности Мак Фарланда (R092В стандарт 1 ед.) в объеме 0,5 мл. Контрольной группе животных (n=10) вводили аналогичное количество физиологического раствора.

Кровь у экспериментальных крыс отбирали из латеральной хвостовой вены двукратно, через 3 и через 6 месяцев после введения лимфоцитов. Потомство крыс (F₁) содержали совместно с родителями и исследовали двукратно в возрасте 3 и 6 месяцев. Наличие BLV-инфекции у крыс опытной группы устанавливали методом ПЦР на оборудовании Bio-Rad (USA) с использованием набора «Лейкоз» (ИЛС, Россия). Общий анализ крови (ОАК) выполняли на гематологическом анализаторе автоматического типа PCE-90VET (USA).

Молекулярно-генетический анализ показал, что все экспериментальные животные были BLV-инфицированы на момент гематологических исследований. Животные контрольной группы были BLV-интактны.

При сравнительной оценке данных гематологических исследований мы принимали во внимание референсные значения для крыс линии Wistar, однако эталонными считали результаты исследований контрольных групп. Динамика показателей общего анализа крови крыс представлена в табл. 1, 2.

Таблица 1

Данные общего анализа крови взрослых крыс

| Показатель | 9 мес | | 12 мес | |
|--------------------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | контроль | опыт | контроль | опыт |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| RBC, 10 ¹² /л | 7,4±0,7 | 5,8±0,6* | 7,8±0,7 | 5,5±0,5* |
| HGB, g/l | 148,0±14,3 | 128,0±12,2* | 153,0±15,6 | 124,0±12,4* |
| RDWc, % | 12,3±1,2 | 13,2±2,9 | 12,1±1,1 | 13,0±3,1 |
| MCV, fl | 48,8±4,6 | 53,9±6,2 | 49,1±4,7 | 55,2±6,3* |

Окончание табл. 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------|------------|-------------|------------|-------------|
| WBC, 10 ⁹ /л | 7,5±0,6 | 9,1±5,2* | 7,3±0,6 | 9,9±5,6* |
| LYM, % | 56,8±4,6 | 66,7±8,4* | 51,2±5,8 | 69,3±9,9* |
| MID, % | 3,6±0,3 | 4,4±1,5* | 4,1±0,4 | 5,2±2,6* |
| GRA, % | 39,6±3,5 | 28,9±4,9* | 44,7±4,2 | 25,5±4,1* |
| PLT, 10 ⁹ /л | 440,0±43,0 | 468,0±164,0 | 460,0±48,0 | 484,0±166,0 |
| MPV, fl | 5,9±0,5 | 6,4±2,7 | 5,5±0,4 | 6,1±2,6 |

* Отличие опытной группы от контрольной (P≤0,05).

Как следует из данных, представленных в табл. 1, количество эритроцитов и содержание гемоглобина в крови животных опытной группы было достоверно снижено на протяжении всего периода наблюдения на 21,6 и 15,6; 29,5 и 23,4 % через 3 и 6 месяцев от начала эксперимента соответственно. Более медленное снижение содержания гемоглобина относительно количества эритроцитов свидетельствует, что анемия вначале имела компенсаторный характер, однако выявленная тенденция характеризует снижение компенсаторных механизмов со временем.

Показатели ширины распределения эритроцитов по объему и среднего объема эритроцитов не имели выраженных отличий от контроля в среднем, однако значительно варьировали в индивидуальном отношении по животным, как и содержание тромбоцитов, а также их объем.

Что касается белых клеток крови и относительной концентрации их различных фракций, можно констатировать увеличение содержания лейкоцитов, а также фракций лимфоцитов и средних клеток (эозинофилы, моноциты) на 21,3; 17,4; 22,2 и 35,6; 35,4; 26,8 % через 3 и 6 месяцев соответственно. Фракция гранулоцитов, напротив, была снижена значительно – на 37 и 75,3 % также при достаточно выраженных индивидуальных различиях показателя у отдельных особей.

Таблица 2

Данные общего анализа крови потомства F₁ инфицированных крыс

| Показатель | 3 мес | | 6 мес | |
|--------------------------|------------|--------------|------------|--------------|
| | контроль | опыт | контроль | опыт |
| RBC, 10 ¹² /л | 7,1±0,7 | 5,1±0,5* | 7,6±0,7 | 4,7±0,4* |
| HGB, g/l | 139,0±14,1 | 118,0±9,8* | 151,0±14,8 | 102,0±9,7* |
| RDWc, % | 12,7±1,2 | 13,2±3,3 | 11,9±1,9 | 14,3±2,6* |
| MCV, fl | 50,1±4,9 | 55,4±7,1 | 51,1±4,9 | 56,8±6,9* |
| WBC, 10 ⁹ /л | 6,7±0,7 | 8,7±3,9* | 7,2±0,8 | 9,4±3,8* |
| LYM, % | 49,8±5,6 | 57,6±9,5* | 54,6±5,2 | 68,9±9,2* |
| MID, % | 3,2±0,3 | 4,0±1,7* | 3,8±0,4 | 4,8±1,5* |
| GRA, % | 47,0±4,6 | 38,4±6,3* | 41,6±3,8 | 26,3±4,3* |
| PLT, 10 ⁹ /л | 384,0±39,2 | 450,0±153,4* | 408,0±41,5 | 490,0±194,5* |
| MPV, fl | 5,5±0,5 | 6,9±3,1* | 6,0±0,6 | 7,5±2,7* |

* Отличие опытной группы от контрольной (P≤0,05).

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 2, у потомства инфицированных крыс морфологические изменения крови были выражены более значительно. Помимо снижения количества эритроцитов и содержания гемоглобина крови на 39,2; 17,8 и 61,7; 48 % относительно контроля в возрасте 3 и 6 месяцев соответственно, у 6-месячных крыс группы F₁ показатели ширины распределения эритроцитов по объему и среднего объема эритроцитов возрастали на 20,2 и 11,2 % в сравнении с контролем соответственно. Помимо этого, у потомства инфицированных крыс средние показатели содержания тромбоцитов и их среднего объема также возрастали на 17,2; 25,5 и 20,1; 25,0 % в возрасте 3 и 6 месяцев соответственно при значительном колебании этих показателей у животных в индивидуальном отношении.

Количество лейкоцитов в крови животных опытной группы возрастало на 29,9 и 30,6 % с течением времени, при этом содержание фракции лимфоцитов увеличивалось на 13,5 и 26,2, а средних клеток крови – на 25,0 и 26,3 % соответственно относительно контроля в 3- и 6-месячном возрасте. Содержание фракции гранулоцитов снижалось в сравнении с контролем на 22,4 и 58,2 % в динамике эксперимента.

Резюмируя вышесказанное, с учетом индивидуальных показателей животных, можно констатировать, что общий анализ крови крыс выявил выраженный в той или иной степени лимфолейкоз у 75 % животных и нейтропению, что является характерным для лейкозного процесса, индуцированного возбудителем ЭЛ КРС [11]. Количество лимфоцитов в крови крыс опытной группы было на 17–36 % больше, чем у животных контрольной группы, лейкоцитов – в среднем на 30 %, что коррелирует с данными А.В. Скорикова с соавт. [12], полученными при исследовании BLV-инфицированного крупного рогатого скота. У некоторых крыс опытной группы отмечался незначительный тромбоцитоз при увеличении среднего объема тромбоцитов, у других животных, напротив, выявляли тромбоцитопению. У животных опытной группы присутствовали признаки эритроцитарной аплазии, гемолитической или апластической анемии. У отдельных крыс отмечали маркеры аллергии. Стоит отметить, что при индивидуальном отслеживании гематологических показателей через 3 и 6 месяцев после заражения было установлено, что у 80 % животных степень выраженности лимфолейкоза варьировала в значительных пределах. Это позволяет нам предположить наличие цикличности инфекционного процесса по аналогии с цикличностью лейкозного процесса у крупного рогатого скота [13].

Полученные нами данные свидетельствуют, что характерные для лейкозной инфекции признаки были выражены у экспериментальных животных более значительно и развивались у них более стремительно при внутрибрюшинном способе заражения в сравнении с пероральной BLV-инфекцией крыс [14]. Характерным было также то, что количество животных с маркерами аллергической реакции при внутрибрюшинном заражении было меньше, чем при пероральном. Это позволяет нам рекомендовать внутрибрюшинный способ заражения лабораторных крыс взвесью лимфоцитов инфицированного скота для более быстрого и информативного воспроизведения экспериментальной BLV-инфекции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle* / M. Polat, Н.Н. Мое, Т. Shimogiri [et al.] // Arch Virol. – 2017. – Vol. 162. – P. 425–437.
2. *Иммунорфологические изменения, сопровождающие развитие гемобластозов человека и животных* / П.Н. Смирнов, В.В. Храпцов, С.Н. Магер [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2017. – № 4 (18). – С. 39–50.
3. *К вопросу вакцинопрофилактики лейкоза крупного рогатого скота* / И.М. Донник, М.И. Гулюкин, В.А. Бусол [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2020. – № 1. – С. 3–6.
4. *Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue* / G.C. Buehring, H.M. Shen, H.M. Jensen [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2014. – N 20. – P. 772–782.
5. *Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study* / G.C. Buehring, H.M. Shen, H.M. Jensen [et al.] // PLOS One. – 2015. – N 10(9). – P. e0134304.
6. *Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development* / G.C. Buehring, H. Shen, D.A. Schwartz [et al.] // PLOS One. – 2017. – N 12(6). – P. e0179367.
7. *Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте* / М.И. Гулюкин, Н.Г. Козырева, Л.А. Иванова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2015. – Т. 60, № 5. – С. 32–37.

8. *In vivo* study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex / K. Boris–Lawrie, V. Altaneroва, C. Altaner [et al.] // J. Virol. – 1997. – N 71(2). – P. 1514–1520.
9. Гематологические показатели крыс линии Wistar при экспериментальной BLV-инфекции / Е.С. Красникова, А.В. Красников, Р.В. Радионов [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2018. – № 4 (22). – С. 138–145.
10. Биохимические изменения крови крыс линии Wistar при экспериментальной BLV-инфекции / Е.С. Красникова, А.В. Красников, Р.В. Радионов [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2019. – № 2 (24). – С. 69–75.
11. Иванова О.Ю., Пронин В.В., Иванов О.В. Изучение динамики гематологических показателей у коров на разных стадиях лейкозного процесса // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 3(31). – С. 85–88.
12. Показатели лейкоцитарного профиля и резистентности крупного рогатого скота при проведении противолейкозных мероприятий / А.В. Скориков, Н.Ю. Басова, М.А. Староселов [и др.] // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2018. – Т. 7, № 3. – С. 193–198.
13. Смирнов П.Н. Хронобиологические исследования патологического процесса при лейкозе жвачных // Инновации и продовольственная безопасность. – 2016. – № 4 (14). – С. 7–14.
14. *The hematobiochemical status of Wistar rat line under the bovine leukemia virus experimental infection* / E.S. Krasnikova, A.S. Belyakova, F. Bouchemla [et al.] // Veterinary World. – 2019. – Vol. 12, N 3. – С. 382–388.

REFERENCES

1. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle / M. Polat, H.H. Moe, T. Shimogiri [et al.] // Arch Virol. – 2017. – Vol. 162. – R. 425-437.
2. Immunomorfologicheskie izmeneniya, soprovozhdayushchie razvitie gemoblastozov cheloveka i zhivotnyh / P.N. Smirnov, V.V. Hramcov, S.N. Mager [i dr.] // Innovacii i prodovol'stvennaya bezopasnost'. – 2017. – № 4 (18). – S. 39-50.
3. K voprosu vakcinoprofilaktiki lejkoza krupnogo rogatogo skota / I.M. Donnik, M.I. Gulyukin, V.A. Busol [i dr.] // Veterinariya Kubani. – 2020. – № 1. – S. 3-6.
4. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue / G.C. Buehring, H.M. Shen, H.M. Jensen [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2014. – N 20. – R. 772-782.
5. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case–control study / G.C. Buehring, H.M. Shen, H.M. Jensen [et al.] // PLOS One. – 2015. – N 10(9). – R. e0134304.
6. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development / G.C. Buehring, H. Shen, D.A. Schwartz [et al.] // PLOS One. – 2017. – N 12(6). – R. e0179367.
7. Mezhhvidovaya peredacha virusa lejkoza krupnogo rogatogo skota v eksperimente / M.I. Gulyukin, N.G. Kozyreva, L.A. Ivanova [i dr.] // Voprosy virusologii. – 2015. – T. 60, № 5. – S. 32-37.
8. *In vivo* study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex / K Boris-Lawrie, V Altaneroва, C Altaner [et al.] // J. Virol. – 1997. – N 71(2). – R. 1514-1520.
9. Gematologicheskie pokazateli kryс linii Wistar pri eksperimental'noj BLV-infekcii / E.S. Krasnikova, A.V. Krasnikov, R.V. Radionov [i dr.] // Innovacii i prodovol'stvennaya bezopasnost'. – 2018. – № 4 (22). – S. 138-145.
10. Biohimicheskie izmeneniya krovi kryс linii Wistar pri eksperimental'noj BLV-infekcii / E.S. Krasnikova, A.V. Krasnikov, R.V. Radionov [i dr.] // Innovacii i prodovol'stvennaya bezopasnost'. – 2019. – № 2 (24). – S. 69-75.

11. Ivanova O.YU., Pronin V.V., Ivanov O.V. Izuchenie dinamiki gematologicheskikh pokazatelej u korov na raznyh stadiyah lejkoznogo processa // Vestnik Ul'yanovskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii. – 2015. – № 3(31). – S. 85-88.

12. Pokazateli lejkocitarnogo profilya i rezistentnosti krupnogo rogatogo skota pri provedenii protivolejkoznyh meropriyatij / A.V. Skorikov, N.YU. Basova, M.A. Staroselov [i dr.] // Sbornik nauchnyh trudov Krasnodarskogo nauchnogo centra po zootekhnii i veterinarii. – 2018. – T. 7, № 3. – S. 193-198.

13. Smirnov P.N. Hronobiologicheskie issledovaniya patologicheskogo processa pri lejkoze zhvachnyh // Innovacii i prodovol'stvennaya bezopasnost'. – 2016. – № 4 (14). – S. 7-14.

14. The hematobiochemical status of Wistar rat line under the bovine leukemia virus experimental infection / E.S. Krasnikova, A.S. Belyakova, F. Bouchemla [et al.] // Veterinary World. – 2019. – Vol. 12, N 3. – S. 382-388.