

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
МИЧУРИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Белякова Анастасия Сергеевна

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС
ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
VLV-ИНФЕКЦИИ**

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

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Лейкоз крупного рогатого скота: возбудитель заболевания, восприимчивые организмы и экспериментальная <i>BLV</i> -инфекция	10
1.2. Клинико-морфологические и биохимические маркеры крови при энзоотическом лейкозе крупного рогатого скота.....	14
1.3. Иммунологические механизмы при лейкозе крупного рогатого скота.....	20
1.4. Цитологические изменения в иммунокомпетентных органах при лейкозе крупного рогатого скота.....	25
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Материал и методы исследования.....	31
2.2. Результаты исследований и их обсуждение.....	36
2.2.1. Динамика гематологического статуса лабораторных крыс при экспериментальной <i>BLV</i> -инфекции.....	36
2.2.2. Динамика цитокинового статуса лабораторных крыс при экспериментальной <i>BLV</i> -инфекции.....	46
2.2.3. Разработка нового способа моделирования <i>BLV</i> -инфекции.....	54
2.2.4. Цитологические изменения в селезенке крыс при экспериментальной <i>BLV</i> -инфекции.....	62
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	71
ВЫВОДЫ.....	75
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	76
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	77
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	78
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	79
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	98
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	100

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Проблема энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) является одной из наиболее актуальных дилемм последнего столетия [39]. Несмотря на то, что большинство зараженных животных выступают бессимптомными носителями вируса, у них могут проявляться иммунологические дисфункции, служащие причиной экономических потерь в связи со снижением продуктивности [128], высоким уровнем инфекционных заболеваний [125] и репродуктивных нарушений [84]. Вопреки всем попыткам, так и не удалось разработать достаточно эффективные экономически обоснованные способы предотвращения распространения этого заболевания среди животных [82]. Кроме того, в последние годы появляется все больше сообщений о возможной роли *bovine leukemia virus (BLV)* в возникновении онкопатологии у женщин [92], при этом доказано, что вирус присутствует в эпителии молочной железы [85]. Известно, что многие вирусы, в том числе и онкогенные, естественным образом преодолевают межвидовой барьер, и, попав в гетерологичную популяцию, приобретают свойство распространяться в ней [149]. В этой связи исследование иммуноморфологических проявлений *BLV*-инфекции в популяции гетерологичных восприимчивых организмов является актуальной и перспективной темой в области, как фундаментальной, так и прикладной ветеринарной патологии и онкологии.

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.

Известно, что *BLV* в естественных условиях заражает крупный рогатый скот, зебу и водяного буйвола, но также может быть

экспериментально передан овце, козе или альпаке [86, 139]. Опытным путем доказано, что возбудитель лейкоза передается от больного скота к восприимчивому с инфицированными лимфоцитами и провоцирует развитие иммуносупрессивного состояния, характеризующегося закономерными изменениями клинико-морфологических и биохимических показателей крови [40, 78]. Достаточно подробно изучены структура и функции генома *BLV* [138]. Показана возможность передачи возбудителя кроликам [38] и лабораторным крысам [150]. При изучении ретровирусных заболеваний лабораторные модели имеют большое практическое значение с точки зрения экономии времени и средств, а также возможности изучения вируса и его эффектов в живом организме на нескольких генерациях животных. В частности V.W. Valeri et al. (2010) было выявлено, что мутации генома близкородственного *BLV* возбудителя Т-клеточной лимфомы человека (*HTLV-1*) отражаются на его инфекционности для человека и макака, но не влияют на репликацию этого вируса у кроликов [141]. Однако не исключается возможность некоторых ограничений, связанных с отсутствием специфических клинических проявлений заболевания или неадекватного иммунного ответа. Ряд исследователей констатируют, что *BLV*-инфекция у кроликов сопровождается выработкой специфических антител, но при этом нет сообщений о развитии у данной лабораторной модели специфических для ЭЛ КРС проявлений [2, 18]. В тоже время показано, что лабораторные крысы не только восприимчивы к возбудителю ЭЛ КРС, но в ряде случаев у них фиксируются характерные гематологические изменения и пролиферативные процессы на печени и кишечнике [50].

Исследования, посвященные изучению иммуноморфологических проявлений *BLV*-инфекции в организме лабораторных крыс, в современной научной литературе не представлены. В тоже время, анализ таких данных, особенно в сравнительном аспекте с иммуноморфологическими изменениями у зараженного вирусом энзоотического лейкоза крупного

рогатого скота, представляет собой ценные для онкологии сведения, так как поможет оценить адекватность данной лабораторной модели при изучении *BLV*-инфекции.

Цель и задачи исследования. Целью наших исследований явилось изучение динамики иммуноморфологического статуса лабораторных крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции.

В связи с поставленной целью, был определен ряд задач:

1. Выполнить сравнительный анализ динамики гематологических показателей лабораторных крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции.

2. Проанализировать динамику цитокинового статуса лабораторных крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции.

3. Осуществить компаративную оценку цитологических изменений в селезенке лабораторных крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции.

4. Адаптировать внутрибрюшинный способ заражения лабораторных крыс с целью воспроизведения экспериментальной *BLV*-инфекции.

Научная новизна. Научная новизна выполненных исследований заключается в том, что впервые осуществлен комплексный многопараметрический анализ динамики клинико-морфологических и биохимических показателей крови лабораторных крыс линии Wistar, их цитокинового статуса на уровне интерферонов, системы комплемента и анафилотоксинов, а также цитологических изменений селезенки в сравнении с таковыми показателями интактных животных. В результате гематологических исследований впервые установлено, что *BLV*-инфекция лабораторных крыс линии Wistar при парентеральном способе заражения сопровождается характерными для лейкемии и более динамичными проявлениями по сравнению с пероральным способом инфицирования. С помощью ИФА-анализа впервые выявлены иммунологические дисфункции у *BLV*-инфицированных лабораторных крыс. Впервые цитологические исследования показали прогрессивные патоморфологические изменения в ткани селезенки зараженных ЭЛ КРС лабораторных крыс.

По результатам исследований получен патент на изобретение РФ «Диагностическая система для выявления ДНК провирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота методом мультиплексной полимеразной цепной реакции» (№ 2615465 С от 04.04.2017), подана заявка на патент РФ на изобретение (№ 2019110652 от 10.04.2019) «Способ моделирования *BLV*-инфекции у экспериментальных животных».

Теоретическая и практическая ценность работы. Полученные результаты исследований помогают раскрыть фундаментальные механизмы развития иммунологических дисфункций у лабораторных крыс линии Wistar при экспериментальной *BLV*- инфекции. Данные, характеризующие отклонения клинико-морфологических и биохимических показателей крови, цитокинового профиля, а также цитологические изменения в селезенке зараженных крыс относительно интактных животных имеют общебиологическое значение и ценны для такой науки, как онкология в понимании аспектов генеза иммуноморфологических нарушений и для разработки способов их коррекции при гемобластозах у животных.

Полученные в исследованиях данные позволяют рекомендовать лабораторных крыс линии Wistar для изучения иммуноморфологических проявлений *BLV*- инфекции, в том числе у потомства, полученного от инфицированных животных. Данная модель при разработанном нами способе инфицирования может быть использована для обоснования механизма действия и оценки эффективности иммунобиологических препаратов, в рамках планирования и реализации лечебно-профилактических и диагностических мероприятий при ЭЛ КРС.

Методология и методы исследования. Методологической основой проведенных исследований явилась научно обоснованная постановка проблемы использования лабораторных крыс линии Wistar для изучения иммуноморфологических проявлений *BLV*- инфекции. Для достижения поставленной цели и решения задач использовались клинико-морфологические, биохимические, иммунологические,

цитоморфологические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования с применением современного оборудования. Особенностью данной работы является раскрытие иммуноморфологических закономерностей при *BLV*-инфекции у крыс линии Wistar и выявление корреляционной взаимосвязи с изменениями, детектируемыми у крупного рогатого скота при энзоотическом лейкозе.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Динамика иммуноморфологических проявлений у крыс линии Wistar при экспериментальной *BLV*-инфекции характеризуется прогрессированием гематологических, иммунологических и цитологических изменений.

2. Выявлена корреляция иммуноморфологических изменений у крыс линии Wistar и у крупного рогатого скота при *BLV*-инфекции.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена исследованием статистически значимого по объему экспериментального материала и подтверждена тем, что все данные клинико-морфологических, биохимических, иммунологических, цитоморфологических, молекулярно-генетических исследований получены с использованием стандартных методик на современном оборудовании с последующей статистической обработкой.

Основные результаты научных исследований представлены, обсуждены и получили положительную оценку на конференциях различного уровня: VIII-й Международной студенческой научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии» (Саратов, 2015); Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (Челябинск, 2016); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий» (Саратов, 2017, 2018 гг.); материалы Международной научно-практической конференции «Вклад ученых в

повышение эффективности агропромышленного комплекса России» (Саратов, 2018); XIV Международной научно-практической конференции «Аграрная наука - сельскому хозяйству» (Саратов, 2019); 72-ой Международной научно-практической конференции студентов и аспирантов «Агровуз-2020: образование, наука, инновации» (Мичуринск, 2020); Международной научно-практической конференции «AGRITECH-IV – 2020 International Conference on Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies» (Красноярск, 2020); Международной научно-практической конференции «От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение сельского хозяйства», посвященной 180-летию ФГБОУ ВО «Донского государственного аграрного университета» (Ростовская обл., пос. Персиановский, 2020).

Материалы исследований используются в учебном процессе и при выполнении научных исследованиях во 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 клинико-морфологических, биохимических, иммунологических, цитоморфологических, молекулярно-генетических исследований, статистической обработки результатов, а также формирование выводов на основании полученных данных осуществлены лично автором под руководством научного руководителя.

Публикации. По материалам исследований опубликована 20 научных статей, в которых освещены основные положения и выводы диссертации, в том числе 6 статей в изданиях, включенных в Перечень ВАК РФ («Научная жизнь», «Вестник КрасГАУ», «Инновации и продовольственная безопасность», «Аграрный научный журнал») и 1 статья в журнале, индексируемом международной базой данных Scopus. По результатам

исследования получен 1 патент РФ на изобретение и подана 1 заявка на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 104 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, выводов, а также списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 16 рисунками. Список литературы содержит 160 источников, в том числе 88 зарубежных.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Лейкоз крупного рогатого скота: возбудитель заболевания, восприимчивые организмы и экспериментальная *BLV*-инфекция

В результате неконтролируемой экспансии возбудителя энзоотического лейкоза крупного рогатого скота в послевоенные годы, в период восстановления животноводства на Европейской территории, начиная с середины прошлого столетия это заболевание быстро распространилось, особенно в странах с прогрессивным молочным скотоводством. Развитие внешних экономических взаимоотношений между государствами привело не только к экспансии вируса на всех континентах, но и к его значительному генетическому разнообразию, что является собой угрозой развития скотоводства, как продуктивного, так и племенного [67].

Возбудителем заболевания является вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС), относящийся к роду *Deltaretrovirus* семейства *Retroviridae*. Первый случай лейкоза крупного рогатого скота впервые был описан в 1871 году, а его возбудитель был выделен только в 1969 году [159]. ВЛ КРС, как и другие представители данного семейства, может многие годы не проявлять себя в заражённом организме, делая его скрытым источником инфекции. У крупного рогатого скота *BLV* идентифицируется в основном в лимфоцитах крови (В-клетках), эндотелиальных клетках [132], в эпителиальных клетках молочной железы [89], а у животных с высокой провирусной нагрузкой *BLV* обнаруживается в носовом секрете и слюне [100]. Вирус передается чаще горизонтально (при контакте, случке, с пищей, гематофагами, ятрогенным путем) и, реже, вертикально (от матери к плоду), в основном у животных с клиническими проявлениями лейкозной инфекции [133].

BLV-инфекция проявляется в нескольких формах: бессимптомное вирусоносительство, гуморальный иммунный ответ без изменений на гематологическом уровне, персистентный лимфолейкоз и лимфосаркома.

Только у 5% инфицированных животных развивается стойкая лейкемия или лимфома, остальные 95% инфицированных животных остаются субклиническими носителями, при этом примерно треть из них проявляют персистирующий лимфоцитоз - незлокачественную пролиферацию нетрансформированных В-лимфоцитов [83, 138]. Злокачественная моноклональная В-клеточная лимфосаркома развивается лишь у 1–5% *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота. [133].

Специфика клинико-эпизоотического процесса ЭЛ КРС обусловлена, в первую очередь, биологическими особенностями возбудителя заболевания. Обратная стратегия генома *BLV* являет собой предел эволюции паразитизма, имеющего своей целью сохранение вируса, как биологического вида лишь на уровне генотипа, с временной утратой стандартных фенотипических свойств (морфология, структура, размножение) [131]. Это аргументирует такие особенности патобиоза при лейкозе, как злокачественное перерождение инфицированной клетки, репликацию вирусного генома в процессе моноклональной пролиферации лимфоцитов, выраженную иммунную эвазию эффекторов противовирусной защиты врожденного и приобретенного иммунитета, клеточноопосредованное распространение заболевания по эпизоотической цепи [75]. Энзоотичность лейкоза крупного рогатого скота вызвана клиническим диморфизмом заболевания, а также абсолютным преобладанием инкубационного периода в течении болезни, что обуславливает скрытую криптическую форму инфекции на протяжении большей части жизни животного [36].

В естественных условиях облигатными хозяевами *BLV* являются крупный рогатый скот, водяные буйволы, а также капибара и зебу [75], однако *BLV* также может быть экспериментально привит и другим видам животных, таким как овцы [136], козы [117], свиньи [129], крысы [42], кролики [76], бестимусные голые мыши (Nude) [120] и цыплята [77]. Тем не менее, стойкую лейкемию и лимфому *BLV* вызывает только у крупного

рогатого скота и овец [75, 130]. При этом, у экспериментально зараженных овец В-клеточные опухоли развиваются с более высокой частотой и с более коротким латентным периодом, чем у естественно инфицированного крупного рогатого скота [75]. Интересно, что трансформированные В-лимфоциты крупного рогатого скота представляют собой $CD5^+ IgM^+$ В-клетки [151], тогда как у овец они представляют собой $CD5^- IgM^+$ В-клетки [119]. Это позволяет предположить, что механизмы *BLV* индуцированного лейкогенеза у них могут различаться.

BLV филогенетически тесно связан с *HTLV-1*, который является возбудителем Т-клеточного лейкоза и хронического неврологического расстройства, известного как тропический спастический парапарез или *HTLV-1*-миелопатия у людей [130]. Важно отметить, что *BLV* был обнаружен в эпителии молочной железы женщин [85, 88], в связи с чем вирус позиционируют, как провокационный фактор канцерогенеза человека [109]. В дополнение к многочисленным исследованиям, показывающим, что диапазон восприимчивых к *BLV* организмов широк, можно констатировать, что вирус успешно инфицирует различные клетки *in vitro*, в том числе фибробласты человека [123]. Это может быть связано с тем, что провирус *BLV* кодирует ряд дополнительных вспомогательных генов, среди которых *Tax* и *G4* являются онкогенами, способствующими трансформации первичных фибробластов некоторых видов животных [120].

Особенности воспроизведения экспериментальной *BLV*-инфекции связаны с тем, что заболевание передается в основном посредством инфицированных провирусом клеток, а не внеклеточного вириона. Потенциальными источниками передачи трансформированных вирусом клеток являются, в первую очередь, биологические жидкости: кровь, молоко и молозиво, их инфицирующая способность напрямую связана с количеством лимфоцитов в жидкости [59]. По этой причине используют пероральный способ инфицирования молоком или кровью больных животных [2]. В своих исследованиях М.И. Гулюкин и соавт. (2015)

подтвердили факт инфекционности молока, полученного от больных энзоотическим лейкозом коров, показав при этом возможность межвидовой передачи возбудителя ЭЛ КРС алиментарным путем кроликам. Основываясь на результатах выявления маркеров *BLV*-инфекции у экспериментальных животных, таких как присутствие специфических противовирусных антител методами РДП и ИФА, а также генома возбудителя методом ПЦР, было показано, что все экспериментальные животные являлись инфицированными. Как минимум однократно у них был зафиксирован положительный результат, что доказывает факт воспроизведения на кроликах *BLV*-инфекции [38]. Хочется отметить, что однократное или двукратное скармливание врятли спровоцирует развитие инфекции. А длительное кормление кровью или молоком больных энзоотическим лейкозом коров наверняка будет иметь побочные эффекты у животных. В частности в своих исследованиях мы отмечали признаки нарушения обмена веществ и аллергии у экспериментальных животных, которым в течение года скармливали молоко больных лейкозом коров [150].

Заражающий материал при экспериментальной инфекции может быть введен лабораторным животным разными способами. Наиболее часто используют внутримышечное, внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное, интраназальное и интрацеребральное введение. Выбор метода введения материала зависит, в первую очередь, от тропизма вируса. Таким образом, материал вводят в органы, имеющие клетки, восприимчивые к данному вирусу. В частности, респираторные вирусы вводят интраназально, эпителиотропные - внутрикожно, нейротропные - интрацеребрально, пантропные - внутривенно или внутрибрюшинно. Вирус лейкоза или гемобластоза, как его еще называют, относят к лимфотропным вирусам, но так как злокачественной пролиферации подвергаются лимфоидные клетки во многих органах и тканях, очевидно, что внутривенное или внутрибрюшинное введение будет достаточно эффективным при экспериментальном заражении.

Согласно имеющимся в научной литературе данным, исследователи ФГБОУ ВО Дагестанский ГУ осуществляли внутрибрюшинную инфекцию крыс линии Wistar кровью, полученной от людей, болеющих лейкозом, с последующим выявлением у экспериментальных животных антител к *BLV*. Результаты исследований показали, что 1 из 12 особей была слабо РИД положительна [42]. Однако присутствие вирусоспецифических антител, без анализа динамики их образования и, там более, без детекции самого возбудителя и определения провирусной нагрузки на организм не может являться неоспоримым фактом развития инфекционного процесса. Более того, кровь содержит огромное количество различных антигенов: сывороточных белков, форменных элементов крови, а также не исключено присутствие патогенных микроорганизмов. Поэтому поиск более «чистого» пути воспроизведения лейкозной инфекции с параллельным ее обоснованием является важной научной задачей.

1.2. Клинико-морфологические и биохимические маркеры крови при энзоотическом лейкозе крупного рогатого скота

Известно, что *BLV* может сохраняться в нескольких типах клеток [115, 122], однако, очевидно, что основной мишенью вируса являются В-лимфоциты, которые экспрессируют поверхностный иммуноглобулин М [130]. Помимо В-лимфоцитов, *BLV* также сохраняется в клетках линии моноцитов и макрофагов [142].

Поэтому при исследованиях на лейкоз в первую очередь обращают внимание на лейкограмму. Различия в гематологических показателях инфицированного и интактного скота имеют наибольшие отличия по составу лимфоцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов [134]. В пробах крови серопозитивного крупного рогатого скота наблюдается относительное увеличение лимфоцитов при одновременном снижении уровня нейтрофилов и моноцитов [35].

Однако *BLV*-инфекция зачастую может протекать бессимптомно на гематологическом уровне, при этом зараженные животные остаются латентными носителями вируса [139]. Стойкий лимфоцитоз развивается лишь у 30 % инфицированных крупного рогатого скота, а злокачественная лимфосаркома диагностируется менее чем у 5 % инфицированных животных [16]. Реже всего лимфоидный лейкоз у крупного рогатого скота сопровождается эозинофильными реакциями [145].

Лейкоз является лимфопролиферативным заболеванием по своей сути, потому эти клеточные популяции и считают маркером при оценке клинкоморфологического статуса инфицированных животных [124]. Тем не менее, в гематопатологическом процессе принимают участие и другие форменные элементы крови, такие как гранулоциты, пролифилирующие при миелоидном лейкозе, гистиоциты, образующие гранулемы как в лимфоидных органах, так и в органах не относящихся к гемопоетической системе [58], а по некоторым данным определенное диагностическое значение имеют и эритроциты [34, 53]. Вирус лейкоза способен заражать разные популяции иммунокомпетентных клеток, в том числе $CD5^-$ IgM^+ и $CD5^+$ IgM^+ В-клетки; γ/δ Т-лимфоциты, $CD8^+$, $CD4^+$, $CD3^+$, $CD2^+$ клетки; моноциты и гранулоциты лимфоидных тканей и периферической крови крупного рогатого скота [106, 138]. Вследствие этого изменяется морфология крови и, а также ее форменных элементов. В частности, Д.А. Артемьев с соавт. (2018) установили, что у *BLV*-инфицированных лимфоцитов изменяются морфологические свойства самих клеток и биофизические свойства клеточных мембран, что может привести к нарушению их функции [153]. В крови больного лейкозом крупного рогатого скота отмечают значительные скопления бластных элементов. При этом изменяется качественный состав самих лимфоидных клеток: появляются тени Боткина-Гумпрехта, лимфоциты с широким ободком цитоплазмы, двуядерные формы. Не редко наличие измененных лимфоцитарных форм сопровождается акантоцитозом эритроцитов [65].

Начало формирования патологических изменений в крови инициируется с момента проникновения в кровь трансформированных провирусом лейкоза лимфоцитов и экспрессии провируса в вирусные частицы. При первичной репликации *BLV* ответная реакция на уровне крови мало чем отличается от продромального периода другой вирусной инфекции. При персистирующем же лейкозе количество носящих провирус клеток увеличивается главным образом за счет митоза, это связывают с наличием активной иммунной реакции [110]. Эта фаза может длиться несколько месяцев или лет, при этом развивается иммунная дисрегуляция, в частности на уровне цитокинов, которая проявляется общей слабостью и развитием оппортунистических инфекций [130]. Восприимчивость к вторичным инфекциям повышается в результате *BLV*-индуцированной экспрессии ингибирующих рецепторы Т-клеток молекул, что играет важную роль в прогрессировании заболевания [124].

Гематологический статус при *BLV*-инфекции в целом, является индикатором здоровья животных, в том числе комплекс иммунологических, биохимических и молекулярно-генетических маркеров [22, 32]. Как и другие лейкозы, ЭЛ КРС носит характер системного заболевания, в связи с чем, его возникновение, динамика и исход отражаются на гематологическом статусе зараженного организма. Прямая корреляция выражена изменением гематологических параметров при развитии заболевания, а обратная корреляция связана с ролью гематологического статуса животного в восприимчивости к заболеванию и в процессе лейкогенеза [14, 23]. В частности, у восприимчивых к лейкозу животных в крови была обнаружена повышенная активность ферментов креатинкиназы, щелочной и кислой фосфатаз, изменен баланс мочевины, общего белка и его фракций, возросло содержание ионов Ca^{2+} , на фоне снижения активности АСТ, уменьшения содержания триглицеридов и липопротеинов очень низкой плотности, глюкозы, и альбумина.

В числе биохимических показателей крови отмечают указывающие на устойчивость животных к заражению лейкозом или, напротив, на повышенную восприимчивость. В числе первых находятся такие, как низкая активность кислой фосфатазы крови и высокое содержание липопротеинов очень низкой плотности [14].

Сильно коррелируют гематологические показатели со стадией инфекции. По данным Ю.В. Итэсь (2002), биохимический статус спонтанно зараженного энзоотическим лейкозом скота голштинской породы не имеет достоверных различий с интактными к вирусу животными, а при развернутой гематологической стадии, кроме эритропении у животных в крови выявляется изменение аминокислотного состава [26].

При этом обнаруживаются определенные закономерности в гематологических показателях при развитии инфекции. В частности, в крови *BLV*-носителей обнаруживается слабо выраженный лейкоцитоз со сдвигом влево нейтрофильного ядра и умеренная базофилия, незначительно снижается содержание эритроцитов и гемоглобина, несколько повышается уровень билирубина и активность щелочной фосфатазы [31]. У зараженных вирусом лейкоза животных отмечают снижение содержания глюкозы в крови, что может быть обусловлено значительными энергетическими потерями у находящихся в стадии компенсации животных [55]. При развитии гуморальной реакции иммунной системы в ответ на *BLV*-инфекцию крупного рогатого скота в клинико-морфологическом анализе крови отмечают значительное снижение содержания эритроцитов и гемоглобина крови, слабо выраженную тромбоцитопению, повышение показателя скорости оседания эритроцитов и лимфоцитоз с преобладанием бластных форм белых кровяных телец. Биохимическими исследованиями крови выявляют гипоальбуминемию при увеличении показателя общего белка, повышение активности щелочной фосфатазы и значительное увеличение количества билирубина [47, 78]. Исследование обмена веществ зараженного возбудителем ЭЛ КРС показало значительное снижение

щелочного резерва и гемоглобина крови, уменьшение содержания общего белка, глюкозы и Ca^{2+} в сыворотке крови [49]. Данные других исследователей свидетельствуют, что у больных энзоотическим лейкозом коров уровень магния, цинка и железа в сыворотке крови достоверно снижается [55]. В работах других исследователей показано, что у больного лейкозом скота активность продуцирующих иммуноглобулин класса М В-лимфоцитов значительно снижена, так же как и бактерицидная активность сыворотки крови, на фоне увеличения общего содержания Т- и В-лимфоцитов [41].

Анализ литературных источников показывает, что клинко-морфологический и биохимический статус инфицированного и больного энзоотическим лейкозом крупного рогатого скота привлекает внимание многих исследователей. Связано это с тем, что кровь, в качестве «зеркала организма», позволяет оценить не только состояние отдельных органов и систем на основании изменения количественных параметров и сочетания различных ее показателей, но и гомеостаз организма животного в целом [22].

Клинические проявления *BLV*-инфекции достаточно многообразны. При этом злокачественная пролиферация в кроветворных органах не является обязательным симптомом, инфекция *BLV* может приводить и к другим клиническим исходам [75]. Как уже упоминалось выше, большинство *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота, являясь бессимптомными носителями вируса, не проявляют каких бы то ни было клинических признаков заболевания, в том числе и в отношении изменения количества лимфоцитов. Но тем не менее, даже при сохранении физиологического соотношения лимфоцитов и других клеток крови, у *BLV*-инфицированных животных возрастает относительное содержание $\text{CD5}^+\text{IgM}^+$ В-клеток [106]. Это является неоспоримым свидетельством того, что даже у клинически здорового скота при *BLV*-инфекции нарушается иммунологическая регуляция. Это, по-видимому, и является причиной

экономических потерь, связанных со снижением удоев у коров [128], высокой частотой развития инфекционных болезней [125], снижением у животных репродуктивной функции [84], в том числе увеличением индекса осеменения коров и сервис-периода [1]. Примерно треть инфицированного крупного рогатого скота проявляет стойкий лимфоцитоз, вызванный доброкачественной пролиферацией нетрансформированных В-лимфоцитов. Такая пролиферация, как правило, характеризуется стабильным увеличением количества циркулирующих в периферической крови $CD5^+IgM^+$ В-клеток. Менее чем у 5% *BLV*-инфицированного скота развивается злокачественная В-клеточная лимфома, характеризующаяся моно- или олиго-клональной пролиферацией вирусотрансформированных $CD5^+IgM^+$ В-клеток. Проявляется она, как правило, после относительно длительного латентного периода и у животных старше 5-и летнего возраста [119]. Также как и лимфосаркома, характеризующаяся развитием локализованной или, чаще, диффузной опухоли, состоящей из злокачественных лимфоидных клеток, и приводящая к значительному увеличению в объеме и серьезным нарушениям в функционировании пораженного органа. Как правило, это селезенка и лимфатические узлы, но инфильтрация *BLV*-трансформированными неопластическими клетками может отмечаться и во внутренних органах: сердце, сычуге, кишечнике, легких, почках, печени и матке [137]. Клинически *BLV*-индуцированные опухоли проявляются у животных разнообразными патологическими реакциями, но чаще всего они связаны с нарушением пищеварения и, как следствие, снижением аппетита и потерей веса, вплоть до кахексии, а также слабостью и снижением молочной продуктивности, могут отмечаться экзофтальмия и увеличение лимфатических узлов [57]. В опухолевой фазе зараженная клетка подвергается генетической трансформации и формирует лимфому не только внутри, но и вне лимфатического узла или селезенки, в результате чего наступает внезапная гибель животного с явлениями кровоизлияния или даже разрыва селезенки. Опухоль даже может развиваться

у зараженных лейкозом животных, не проявляющих признаки стойкого лимфоцитоза. Причем, некоторые исследователи связывают частоту возникновения опухолей у животных в латентном периоде инфекции со степенью распространения лейкоза в стаде. В частности, при 50%-ном инфицировании поголовья, через три года отмечается 10%-ная смертность среди *BLV*-инфицированных животных [156].

1.3. Иммунологические механизмы при лейкозе крупного рогатого скота

Иммунологические механизмы при ЭЛ КРС обусловлены одновременным функционированием врожденного и приобретенного иммунитета. Скорость ответной реакции гуморального и клеточного компонентов врожденного иммунитета исчисляется секундами и минутами, адаптивная иммунная реакция проявляется не ранее 3 суток, так как требует предварительной активации врожденной. Иммунологическая реакция запускается при появлении в организме патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, а также молекул, образующихся при повреждении или стрессе собственных клеток. Рецепторное распознавание этих молекул приводит к экспрессии цитокиновых генов, что обуславливает динамику гемопоэза, воспаления или канцерогенеза [70].

Система комплемента (ComC) является важнейшим элементом врожденного иммунитета и участвует в процессах, связанных с борьбой с инфекцией [147]. Она являет собой систему зимогенов, активированную в иерархическом протеолитическом каскаде и демонстрирующую множество эффектов. Например, расщепляемые ComC фрагменты, в дополнение к их иммунологическим функциям, модулируют миграцию стволовых клеток во время органогенеза [143]. Имеются доказательства того, что фрагменты расщепления C3 и C5 (C3a и C5a соответственно) регулируют выход гематопоэтических стволовых клеток-предшественников из костного мозга в периферическую кровь [155].

Накоплены данные о том, что ComC играет роль в патогенезе опухолей, изменяя их рост, влияя на их метастатический потенциал и реакцию на терапию [108, 126]. Например, сообщалось, что компонент C1q является ключевым регулятором образования ламеллоподий во время миграции раковых клеток и метастазирования [98], избыточная экспрессия регуляторного белка CD59, являющегося ингибитором мембраноатакующего комплекса, служит биомаркером неблагоприятного прогноза у пациентов с раком молочной железы [151], а повышенная концентрация C5a коррелирует с высоким метастатическим потенциалом при немелкоклеточном раке легкого [79], носоглоточной карциноме [90], почечной карциноме [91] и раке яичников [116]. Эти эффекты связаны с взаимодействием C5a с рецептором C5aR, экспрессируемым на опухолевых клетках, что стимулирует рост опухоли и метастазирование [96, 98].

В отличие от локальных опухолевых процессов, данные о роли ComC в лейкогенезе в научной литературе представлены скудно. Имеются сведения об экспрессии функциональных рецепторов к C3a и C5a на клетках U937 и HL-60 [99, 102]. Изучение функционального рецепторного аппарата клеточных линий лейкемии человека и первичных лейкозных бластов пациентов показали, что у пациентов с лейкемией / лимфомой происходит активация ComC и высвобождение фрагментов расщепления C3 и C5, следствием чего является повышение подвижности злокачественных клеток и их экспансия в инфицированном организме [74].

Этиологическим фактором ЭЛ КРС является онкогенный ретровирус. ComC, как составная часть врожденного иммунитета, обладает способностью распознавать и уничтожать различные патогенные микроорганизмы, включая вирусы, благодаря прямой нейтрализации внеклеточных вирусов [81], лизису инфицированных вирусом клеток [97], индукции антивирусного состояния [127] и усилению вирус-специфических иммунных ответов [147], в частности продукты процессинга C3 [111], C4 и C5 [98] компонентов.

Ретровирусы, к семейству которых принадлежит *BLV*, поддерживают сложный баланс активации и регуляции компонентов комплемента для обеспечения максимальной инфекции без лизиса клетки-хозяина [143]. Так, при ВИЧ-инфекции, в плазме зараженного человека обнаруживается значительное количество свободных вирионов, что позволяет предположить, что эти вирионы устойчивы к комплементарному вирусолиту [140]. Уровень экспрессии поверхностных белков, принимающих участие в комплементарном опосредованном лизисе варьирует у разных типов клеток, поэтому чувствительность или устойчивость ретровирусов к комплементу зависит от типа клетки-хозяина, из которой отпочковались вирионы, так близкородственный к *BLV* вирус - *HTLV-1*, также имеет на своей поверхности регуляторы *ComC*, происходящие из клеток-хозяев [118]. Фактор *H*, являющийся регулятором комплемента, в избытке присутствующим в жидкостях организма, может быть ассоциирован с поверхностью ретровирусов, обеспечивая еще один эффективный механизм ингибирования комплемента [105]. Таким образом, влияя на функционирование врожденного иммунитета, ретровирусы опосредованно воздействуют на приобретенный иммунитет.

Цитокины, не смотря на то, что они являются факторами приобретенного иммунитета, не обладают антигенной специфичностью и являются посредниками межклеточного взаимодействия при развитии иммунной реакции, воспаления или в гемопоэзе. Цитокины синтезируются обширным кругом эффекторных и аффекторных иммунокомпетентных клеток, что диктуется многообразием их функций: стромальные соединительнотканые клетки (гемопоэз), макрофаги (медиаторы воспаления), лимфоциты (лимфокины). Воздействие на любое звено в многоуровневых взаимосвязях цитокинов приводит к нарушению баланса системы и отражается на её функционировании. В частности, повышение синтеза интерлейкинов ИЛ-1 и ИЛ-6 и ФНО- α (фактора некроза опухоли) регистрируют у пациентов с ревматоидным артритом, при различных

травмах и в постоперационный период. Обнаружена взаимосвязь клинической картины заболевания с содержанием ИЛ-6 при развитии аутоиммунных процессов. Ключевая роль в патогенезе септического шока принадлежит образованию ИЛ-1 и ФНО- α . Синтез аутоантител усиливается под влиянием ИЛ-5 и ИЛ-10, а развитие аллергических реакций коррелирует с повышенным образованием ИЛ-3, ИЛ-4 и ИЛ-5. В развитии гиперчувствительности замедленного типа значительная роль принадлежит ИЛ-12. [45].

В ряде случаев цитокины могут выступать в роли ростовых факторов при опухолевых заболеваниях, кроме того, злокачественные клетки могут сами продуцировать аутокринные факторы пролиферации. В тоже время цитокины, в частности ИЛ-2, ФНО и различные ИФН (интерфероны) являются важными противоопухолевыми факторами, которые индуцируют апоптоз злокачественно трансформированных клеток или усиливают противоопухолевую активность макрофагов и естественных киллеров, стимулируя функцию цитотоксических Т – лимфоцитов [48]. Так, в своих исследованиях Г.М. Черноусова и Н.К. Родоская (2009) показали, что у людей больных острым лейкозом выявлено снижение содержания ИЛ-2 на фоне значительного увеличения концентрации ИЛ-4 в сыворотке крови.

Изучение генома КРС показало, что наличие в геноме животных аллелей цитокиновых цепей (GR03; GROX; iNOS2; IL8R), связано с восприимчивостью крупного рогатого скота к вирусу энзоотического лейкоза [71].

Ряд ученых констатируют, что в патогенезе злокачественных опухолей не маловажная роль отводится формированию иммунных комплексов [60]. Кроме того, у *BLV*- инфицированных коров с клиническими осложнениями лейкозного процесса вторичной микрофлорой, показатель пролиферации лимфоцитов крови снижен, что служит маркером нарушения цитокиновой регуляции [63] По некоторым данным, иммунный ответ со стороны Т-лимфоцитов (Th1 фракции),

включая продукцию гамма интерферонов (IFN- γ) и фактора некроза опухолей (TNF- α), нарушается во время прогрессирования заболевания у *BLV* инфицированного КРС [154]. Kosuke Ohira et al. (2016) также констатируют, что продукция цитокинов Th1-лимфоцитами крови *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота IFN- γ и TNF- α была снижена по сравнению с неинфицированным рогатым скотом, а количество Т-клеток, продуцирующих IFN- γ или TNF- α , уменьшалось по мере прогрессирования заболевания. Напротив, продукция IFN- γ киллерами (NK) обратно коррелировала с провирусной нагрузкой у *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота. Кроме того, во время стадий стойкого лимфоцитоза цитотоксичность NK снижалась, на что указывала низкая экспрессия цитолитического белка перфорина. Одновременно с этим, общее количество Т-клеток-иммуносупрессоров возрастало [87]. При анализе таких показателей иммунной регуляции, как экспрессия ряда интерлейкинов (IL-1 β , IL-1 α , IL-4, IL-2, IL-6, IL-12p40, IL-10) и IFN- γ митоген-стимулированными лимфоцитами крови, выделенными от *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота, было установлено, что средний уровень экспрессии IFN- γ и IL-12 был значительно выше у животных с алейкемичной формой заболевания по сравнению с животными с персистентным лимфоцитозом, в то время как существенных различий в экспрессии IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10 не наблюдалось [152].

Выявлено, что нарушение иммунологической регуляции при лейкозах сопровождается такими явлениями, как снижение фагоцитарной активности и бактерицидных свойств крови, нарушение продукции иммуноглобулинов и их дефицит, уменьшение образования лизоцима, незрелость пролифилирующих клеток, снижение способности организма к образованию специфических антител, гипогаммаглобулинемия и уменьшение секреции парапротеина [60, 68, 69].

1.4. Цитологические изменения в иммунокомпетентных органах при лейкозе крупного рогатого скота

Возбудитель энзоотического лейкоза обладает тропизмом к иммунокомпетентным клеткам, поэтому характерные для заболевания цитологические изменения, в первую очередь, обнаруживают именно в них. Это могут быть циркулирующие в крови лимфоциты, локализованные в селезенке или лимфатических узлах клетки, лимфоидные образования во внутренних органах. Есть сообщения о вовлечении в патологический процесс и других клеток крови, что связано с нарушением формирования и созревания этих форменных элементов. Многие исследователи указывают на то, что морфология клеток крови и самих кроветворных органов имеет важное патогенетическое и диагностическое значение при лейкозе.

Еще на заре открытия возбудителя ЭЛ КРС, Г. Нилаж (1953) и М.Г. Абрамов (1962) высказывали мнение, что выявление даже единичных атипичных патологических клеток в крови указывает на заболевание лейкозом. Однако было установлено, что единичные атипичные клетки обнаруживаются в крови РИД-отрицательных животных [35]. Не всякие патологические и атипичные клетки крови, по мнению Г.А. Симонян (1975), являются патогномичными для лейкозного процесса. Для верной интерпретации цитологической картины крови Г.А. Симонян (1975) разработал классификацию клеточных элементов крови и кроветворных органов, выявляемых у больных лейкозом и здоровых животных, основанную на особенностях их морфологической структуры, степени зрелости и принадлежности к тем или иным элементам ткани. К первой группе им были отнесены зрелые, закончившие дифференцировку клетки крови (эозинофилы, базофилы, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, моноциты и лимфоциты). В этой группе клеток патогномичными при лейкозе были признаны лимфоциты, подразделяемые на малые, средние, большие и широкопротоплазменные. Автором было отмечено, что в начале заболевания микроструктура этих

клеток крови аналогична и у больных лейкозом и у здоровых животных. Лишь на поздней стадии болезни морфология лимфоцитов изменяется в силу того, что темпы пролиферации синус-лимфоцитов опережают темпы пролиферации фолликул-лимфоцитов. Ко второй группе, по мнению автора, принадлежат двоядерные лимфоциты, ридеровские клетки, гистиоциты, клетки раздражения, лимфоретикулярные клетки, клетки эндотелия сосудов, макрофаги и другие попадающие в кровяное русло здоровых животных в крайне незначительных количествах тканевые элементы. Увеличение содержания этих клеток в крови происходит при раздражении ретикулоэндотелиальной системы. Третью группу составили малодифференцированные и исходные клетки крови, которые вследствие нарушения процессов формирования и созревания могут появляться в большом количестве в кроветворных органах и попадать в периферическую кровь (формы предшественники и бластные клетки). В четвертую группу были включены атипичные и видоизмененные, так называемые «опухолевые» или «злокачественные» клетки. Эти клетки образуются при повреждении ретикулярной стромы кроветворных органов и характеризуются многообразием морфологии и размеров [57].

О.В. Трофимовым (2013) было продемонстрировано, что микроядра встречаются в лимфоцитах *BLV*-инфицированных животных в 18 раз чаще, чем у интактных. При этом в крови всех РИД-положительных животных были обнаружены скопления бластных клеток, а также различные формы аномальных лимфоцитов: тени Боткина-Гумпрехта, клетки Ридера, лимфоциты с рыхлой структурой хроматина [66]. Другие исследователи также отмечают в крови больных и инфицированных лейкозом коров наличие лимфоцитов с неправильно исчерченными, набухшими, сегментированными ядрами – так называемые ридеровские лимфоциты, а также активированных лимфоцитов с большим количеством псевдоподий [35]. Ультрамикроскопическими методами в *BLV*-инфицированных лимфоцитах обнаруживают такие изменения, как полиморфизм ядер,

появление до 6 и более ядерных карманов, дубликация ядерных и поверхностных мембран митохондрий, гипертрофия мембранного аппарата и увеличение количества митохондрий [13, 54]. Методом атомно-силовой микроскопии удалось обнаружить так называемые «шипы» на поверхности лейкозных клеток, особенно при бластном хроническом лейкозе [146].

При лимфоидном лейкозе морфологические изменения крови характеризуются присутствием большого количества больших и средних лимфоцитов, а также появлением патологических форм клеток, таких как ридеровские и двухъядерные, и молодых, например, пролимфоцитов и лимфобластов [58]. В мазках-отпечатках из лимфоузлов, селезенки и костного мозга также обнаруживают незначительное количество макрофагов и лимфобласты [112]. Чаше они обнаруживаются одновременно в нескольких органах, что может быть связано с процессами метастазирования [107].

При лимфосаркоме патологические элементы прорастают через капсулу лимфоузлов, проникают в прилежащие ткани и органы. В зависимости от того, какого типа опухолевые клетки преобладают, лимфосаркому подразделяют на пролимфоцитарную, лимфобластную, слабодифференцированную, лимфоцитарную и гистиоцитарную [72].

Изредка у скота регистрируют лимфогрануломатозную форму лейкоза, которая характеризуется формированием злокачественных новообразований из лимфатической ткани, отличающихся гранулематозным строением и присутствием гигантских клеток Березовского-Штернберга. Гранулема, как правило, имеет полиморфноклеточный характер и включает в себя лимфоциты, гистиоциты, клетки ретикулярного типа, плазматические и лимфоидные клетки, нейтрофилы и эозинофилы, пронизывающие основу из фиброзной ткани [56].

Заболевания лимфотической системы встречаются у многих видов животных и человека. D.M. Vail et all. (2019) в аспирате из лимфатических узлов собак с диагнозом «лимфома» обнаружили гомогенную популяцию

крупных лимфоидных клеток с выраженными ядрышками и базофильной цитоплазмой, митотические формы и макрофаги, придающие микрокартине вид «звездного неба» [157]. Фенотипическое исследование ткани и клеток, составляющих опухоль, имеет важное значение для диагностики и определения подтипов лимфомы.

Если говорить о характеристике отдельных клеточных форм, лимфобласты представляют собой однородную популяцию неопластических клеток от малых до средних размеров, с округлыми или извитыми ядрами, содержащими изменчивый (от диспергированного до конденсированного) хроматин и слабые нечеткие ядрышки. Объем их цитоплазмы невелик. Часто лимфобласты имеют высокую скорость митоза. Для постановки диагноза требуется выявление более 20–30% бластов в крови или костном мозге [160]. Диагностическим маркером лимфобластного лейкоза является экспрессия клетками CD34 антигена, хотя не существует единого критерия для дифференциации истинных предшественников лейкемии от других лимфопролиферативных форм заболевания [95].

T-клеточные лимфомы встречаются реже, чем их B-клеточные аналоги [94]. Цитоморфология неопластических T-клеток сильно варьирует и может включать различные пропорции мноморфных или полиморфных маленьких, средних или больших клеток с неоднородными овальными или расщепленными ядрами, изменчивым паттерном хроматина, заметными ядрышками и переменной митотической активностью [93]. При подобной патологии обнаруживают клетки от маленького до среднего размера, с умеренным количеством слегка окрашенной цитоплазмы и овальными или эллиптическими ядрами с резкими неглубокими углублениями, мелкозернистым хроматином и незаметными ядрышками. Эти неопластические клетки, имеющие цитоплазматические хвосты, описываются как «ручные зеркала» [148].

В-клеточные лимфомы возникают на разных стадиях развития В-лимфоцитов и представляют собой их злокачественный аналог, и, как таковые, могут быть идентифицированы лимфомы пре-зародышевого и пост-зародышевого центра [135]. Цитоморфологически определяющей особенностью является размер неопластической клетки. В первом случае клетки описываются как промежуточные и большие с ядрами, по крайней мере, в два раза превышающими размер малых лимфоцитов и обычно больше, чем тканевые макрофаги или ядра эндотелиальных клеток. Во втором - клетки такие же большие, с различным количеством цитоплазмы и везикулярных ядер с выступающими ядрышками. У обоих видов количество митотических форм обычно довольно велико, а количество реактивных Т-лимфоцитов и / или гистиоцитов варьирует [103]. В соответствии с морфологией их ядра неопластические клетки обычно характеризуются как напоминающие центробласты, иммунобласты или как промежуточную форму между ними. Центробласты представляют собой клетки среднего и большого размера с ядрами от круглых до овальных с везикулярным хроматином, множественными небольшими ядрышками, расположенными напротив ядерной мембраны, и тонким ободком амфотропной цитоплазмы. Иммунобласты имеют одинаковый размер, везикулярные ядра округлой или овальной формы, одно крупное центрально расположенное ядрышко и широкий обод базотропной цитоплазмы. В зависимости от процентного содержания любого типа клеток, лимфомы можно цитологически разделить на иммунобластную (более 90% иммунобластов) или центробластную (более 90% центробластов) [101].

Лимфомы маргинальной зоны представляют собой группу биологически уникальных форм зрелой В-клеточной неоплазии, которые происходят из постфолликулярных лимфоцитов памяти маргинальной зоны, которая является уникальной областью фильтрации антигенов селезенки и лимфатического узла [80]. В большинстве случаев присутствуют клетки двух типов, а именно: доминантная популяция малого и среднего размера,

содержащая бледную цитоплазму и неправильной формы ядрами, содержащими периферический хроматин и одно центральное ядрышко (центроцитоподобные) и представленная в меньшинстве популяция крупных клеток с ядрами от овальных до почкообразных и обильной бледной цитоплазмой (моноцитойд) [93].

Лимфома из мантийных клеток является необычной формой В-клеточной лимфомы, состоящей из неопластических клеток двух типов: от маленького до среднего размера, содержащих скудную цитоплазму и ядра с изрезанными контурами и равномерно распределенным хроматином; и клетки от малых до средних размеров с круглыми ядрами, конденсированным хроматином и незаметными ядрышками. Можно увидеть редкие крупные клетки [144].

Фолликулярная лимфома - это В-клеточное новообразование из зрелых клеток двух типов. Неопластические центроциты - мелких размеров клетки с прозрачной цитоплазмой, неправильным контуром ядра, бледным и равномерно распределенным хроматином и незаметными или небольшими ядрышками. Неопластические центробласты - это большие клетки с умеренным количеством темной базофильной цитоплазмы, с округлым, овальным и зубчатым, ядра с периферически распределенным хроматином и 1–3 периферически расположенными ядрышками и везикулами. Центроциты обычно более распространены, чем центробласты в неопластических фолликулах, и митотическая активность обычно низкая [113].

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования были использованы 6-и месячные белые лабораторные крысы линии Wistar, которые были инфицированы путем внутрибрюшинного введения взвеси лимфоцитов *BLV*-положительных коров.

Материалом для исследования послужила цельная кровь, сыворотка крови и мазки-отпечатки из селезенки экспериментальных животных.

В исследовании использовали клинико-морфологические, биохимические, цитологические, молекулярно-генетические и иммунохимические методы исследования.

Научно-исследовательская работа включала в себя 3 этапа.

На первом этапе были сформированы контрольная и экспериментальная группы животных с воспроизведением и подтверждением у них *BLV*-инфекции. Крыс разделили на 2 равноценные группы по принципу аналогов. Животных содержали в стандартных клетках группами по 2-3 самки на 1 самца, на полноценном гранулированном корме ООО МЭСТ (ГОСТ Р 50258-92), при свободном доступе к воде. Животные адаптировались к условиям в течение 2 недель, в эксперимент водили только клинически здоровых крыс. Потомство, полученное от крыс, содержали совместно с матерями.

Образцы крови для приготовления инфицирующей взвеси были получены от коров черно-пестрой породы 4-5 летнего возраста из КХ «Заря» Тамалинского района Пензенской области, у которых в крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) был обнаружен провирус *BLV*. Отсутствие провируса возбудителя вирусного иммунодефицита (*BIV*) у крупного рогатого скота определяли методом мультиплексной ПЦР по оригинальной авторской методике (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).

Кровь отбирали из подхвостовой вены коров с использованием вакуумных систем с пробирками для гематологических исследований со стабилизатором КЗ ЭДТА. Транспортировка крови производилась в изотермических термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре + (4 - 8) °С в сумке-холодильнике с соблюдением «холодовой цепи» автомобильным транспортом.

Для приготовления инфицирующей субстанции, свежеполученную стабилизированную кровь *BLV*-инфицированных коров разделяли методом дифференциального центрифугирования при 1500g в течение 10 минут при комнатной температуре в стерильных условиях. Затем фракцию белых клеток крови отбирали стерильным шприцем и разбавляли стерильным физиологическим раствором по стандарту мутности МакФарланда 0,5.

Инфекцию экспериментальной группы лабораторных крыс (n=20) осуществляли путем двукратного внутрибрюшинного введения 0,5 мл стерильной взвеси лимфоцитов *BLV*-иницированного крупного рогатого скота с интервалом в 1 неделю. Животным контрольной группы (n=10) вводили стерильный физиологический раствор по той же схеме.

Факт заражения крыс подтверждали путем ПЦР-анализа их крови на наличие провирусной ДНК. Молекулярно-генетические исследования взрослых крыс осуществляли через 2 недели после первого инфицирования, потомства экспериментальных животных – на момент первого гематологического исследования. Для экстракции и очистки нуклеиновых кислот из крови экспериментальных животных применяли набор «ДНК Сорб В» (ИЛС, Россия). *BLV*-инфекцию у крыс подтверждали методом полимеразной цепной реакции с использованием набора «Лейкоз» (ИнтерЛабСервис, Россия) на оборудовании BioRad (США): амплификацию проводили в термоциклере T100, а детекцию образовавшихся ампликонов -

на оборудовании GelDoc XR. Учет реакции проводили методом горизонтального электрофореза с применением набора «ЭФ» (ИЛС, Россия).

На втором этапе, длительность которого составила 6 месяцев, у животных вели постоянный мониторинг клинического состояния, а также проводили клинико-морфологический и биохимический анализы крови, определяли содержание цитокинов в сыворотке крови.

Кровь отбирали из латеральной хвостовой вены крыс в пробирки для гематологических исследований (ЭДТА - К3) и пробирки для исследования сыворотки Improvacuter (SiO₂). Хранение крови и ее сыворотки не осуществлялось, исследования проводили в день получения.

На гематологическом анализаторе PCE-90VET (США) измеряли 10 клинико-морфологических параметров крови: содержание эритроцитов (RBC) $10^{12}/L$; гемоглобина (HGB) г/л; средний объем эритроцитов (MCV) fL; ширина распределения эритроцитов по объему (RDWc) %; количество тромбоцитов (PLT) $10^9/L$; лейкоцитов (WBC) $10^9/L$; относительная концентрация лимфоцитов (LYM) %; средних клеток крови (MID) %, гранулоцитов (GRA) % и средний объем тромбоцитов (MPV) fL.

Исследование биохимических показателей сыворотки крови выполняли на биохимическом анализаторе полуавтоматического типа BioChemSA (США) с использованием реагентов линии Диакон-ДС (АО «ДИАКОН-ДС», Россия). Анализировали следующие показатели: содержание мочевины ммоль/л, креатинина мкмоль/л, глюкозы ммоль/л, общего белка г/л, альбумина г/л, общего билирубина мкмоль/л, активность ферментов амилазы Ед/л, аланинаминотрансферазы (АЛТ) Ед/л, аспартатаминотрансферазы (АСТ) Ед/л и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) Ед/л.

Для определения иммунного статуса крыс, сыворотку крови исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с тест-системами фирмы «Цитокин» (Россия) на оборудовании Thermo Fisher Scientific (США). На основании полученных величин оптической плотности осуществляли построение графиков в программе Microsoft Excel для расчета

концентраций вещества. Анализировали такие показатели, как содержание интерлейкина 1 бета ($IL-1\beta$) пкг/мл и его антагониста интерлейкина 1 ра ($IL-1Ra$) мкг/мл, компонентов C3 и C4 комплемента нг/мл, протеолитических продуктов системы комплемента C3a и C5a нг/мл.

Все выше обозначенные исследования выполняли через 3 и 6 месяцев после инфицирования экспериментальных животных. У взрослых крыс в возрасте 9 и 12 месяцев, у их потомства – в возрасте 3 и 6 месяцев. Сравнительному анализу в динамике эксперимента подвергали данные *BLV*-положительных крыс.

Статистическая обработка полученных результатов исследований заключалась в определении средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m). Различие данных контрольной и опытной групп считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$.

По результатам данных 1 и 2 этапов исследований был разработан способ заражения крыс для воспроизведения у них *BLV*-инфекции (заявка № 2019110652 от 10 апреля 2019 г.).

Третьим этапом исследований стало изучение канцерогенных эффектов в организме *BLV*-инфицированных крыс.

С этой целью исследовали мазки-отпечатки из селезенки экспериментальных животных. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации после предварительного погружения в эфирный наркоз. Мазки-отпечатки из селезенки окрашивали с применением набора Лейкодиф 200.

Исследование мазков-отпечатков на присутствие атипичных и опухолевых клеточных форм осуществляли на микроскопе флуоресцентном прямом Micray BF-300 (Китай) в режиме микроскопии в проходящем свете при увеличении 1000 раз (100x10). Изображение, полученное с помощью визуализирующей насадки Industrial Digital Camera 5.1 mP (Китай), выводили на экран ПК с использованием прилагающегося к ней программного обеспечения. Осуществляли фотофиксацию микрокартины и

выполняли сравнительный анализ цитологического профиля мазков-отпечатков из селезенки животных опытной и контрольной групп.

Научно-исследовательская работа выполнялась согласно приведенной ниже схеме (рис. 1).



Рисунок 1 – Схема выполнения научных исследований.

2.2. Результаты исследований и их обсуждение

В данном разделе представлены результаты исследований, опубликованные в 20 научных статьях [3 – 11, 17, 21, 27 – 28, 30, 32, 37, 51 – 52, 64, 150], одном патенте РФ на изобретение [20] и одной заявке на патент РФ [62].

2.2.1. Динамика гематологического статуса лабораторных крыс при экспериментальной BLV-инфекции

Для оценки гематологического статуса кровь у экспериментальных крыс отбирали из латеральной хвостовой вены двукратно, через 3 и через 6 месяцев после введения лимфоцитов. 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 ($M \pm m$), представлена в таблицах 1 и 2, основные тенденции отражены на рисунках 2 и 3.

Таблица 1 - Данные общего анализа крови взрослых крыс

Показатель	Группа животных/возраст			
	Контроль / 9 месяцев	Опыт / 9 месяцев	Контроль / 12 месяцев	Опыт / 12 месяцев
RBC, $10^{12}/L$	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*
WBC, $10^9/L$	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, $10^9/L$	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

Примечание: * - отличие опытной группы от контрольной ($p \leq 0,05$).

Как следует из данных, представленных в таблице 1, количество эритроцитов и содержание гемоглобина крови у животных опытной группы

было достоверно снижено на протяжении всего периода наблюдения на 21,6%/15,6% и 29,5%/23,4% через 3 и 6 месяцев от начала эксперимента, соответственно. Более медленное снижение содержания гемоглобина крови 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 и 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 инфицированных крыс

Показатель	Группа животных/возраст			
	F1 контроль / 3 месяца	F1 опыт / 3 месяца	F1 контроль / 6 месяцев	F1 опыт / 6 месяцев
RBC, $10^{12}/L$	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, $10^9/L$	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, $10^9/L$	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*

Примечание: * - отличие опытной группы от контрольной ($p \leq 0,05$).

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 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-и 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 в динамике снижалось в сравнении с контролем на 22,4% и 58,2%.

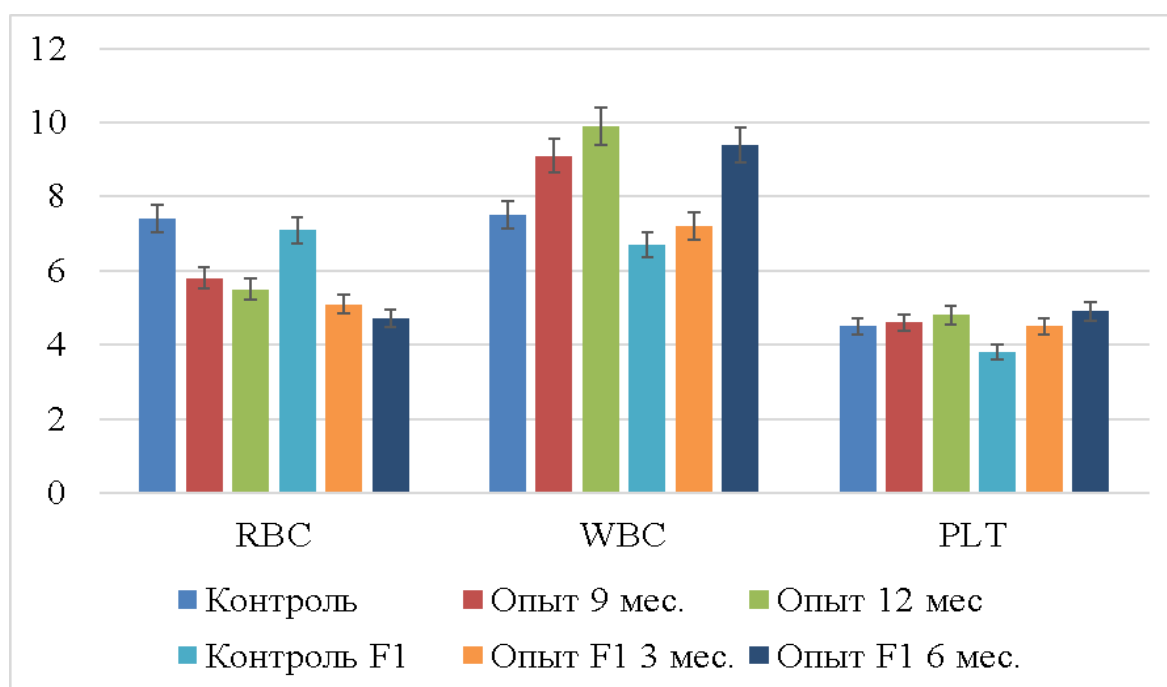


Рисунок 2 – Динамика форменных элементов крыс: эритроциты (RBC), $10^{12}/л$; лейкоциты (WBC), $10^9/л$; тромбоциты (PLT), $10^{11}/л$.

Как показано на рисунке 2, у крыс динамика эритроцитов в экспериментальных группах была отрицательной, в отличие от динамики лейкоцитов, в динамике же тромбоцитов тенденции были слабо выражены и характеризовались незначительным увеличением их количества у потомства опытной группы крыс.

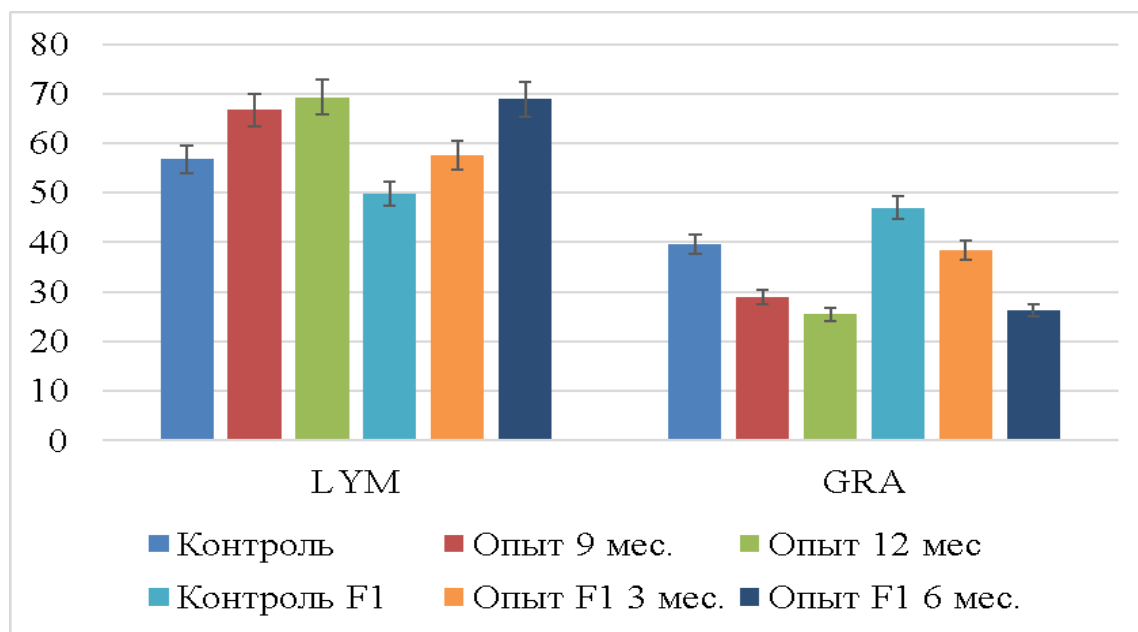


Рисунок 3 – Динамика относительной концентрации лимфоцитов (LYM) и гранулоцитов (GRA) у крыс, %.

Как иллюстрирует рисунок 3, относительное содержание лимфоцитов в крови экспериментальных животных со временем увеличивалось, а гранулоцитов, напротив, снижалось, относительно контроля.

Резюмируя выше сказанное 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 [24]. Количество лимфоцитов 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. (2018), полученными при исследовании BLV-инфицированного крупного рогатого скота [46]. У некоторых крыс опытной группы отмечался незначительный тромбоцитоз при увеличении

среднего объема тромбоцитов, у других животных, напротив, отмечали 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 [59].

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 [150]. 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.

При сравнительном анализе данных биохимических исследований крови мы принимали во внимание референсные значения для крыс линии Wistar, однако эталонными считали результаты исследований контрольных групп. Динамика показателей биохимического анализа крови крыс, ($M \pm m$) представлена в таблицах 3 и 4, основные тенденции отражены на рисунках 4 - 6.

Таблица 3 - Данные биохимического анализа крови крыс

Показатель	Группа животных/возраст			
	Контроль / 9 месяцев	Опыт / 9 месяцев	Контроль / 12 месяцев	Опыт / 12 месяцев
Мочевина, ммоль/л	6,3±0,6	6,9±0,7	6,7±0,7	7,5±0,8*
Креатинин, мкмо/л	47,5±4,8	54,4±6,2*	49,3±5,1	60,4±6,7*
Глюкоза, ммоль/л	4,7±0,5	4,4±0,5	4,5±0,4	3,8±0,5*
Амилаза, Ед/л	475,7±34,2	434,6±41,6	469,7±41,4	387,2±39,1*
Общий белок, г/л	67,3±6,9	62,7±6,4	71,5±7,1	52,8±4,9*
Альбумин, г/л	31,7±2,9	24,8±2,7*	35,1±3,6	25,2±2,7*
АЛТ, Ед/л	68,6±7,1	95,8±9,9*	65,8±6,6	112,4±14,1*
АСТ, Ед/л	76,5±7,5	174,3±16,9*	72,9±7,6	236,1±24,1*
Билиру- бин общ, мкмоль/л	2,5±0,3	6,9±0,8*	2,8±0,3	7,4±0,7*
ЛДГ, Ед/л	435,8±32,3	553,1±54,9*	468,6±45,2	628,4±63,6*

Примечание: * - отличие опытной группы от контрольной ($p \leq 0,05$).

Как следует из данных, представленных в таблице 3, у крыс опытной группы со временем нарастали признаки нарушения функции почек, о чем свидетельствуют увеличение показателя креатинина на 14,5% и 22,5% в динамике эксперимента по сравнению с контролем, и увеличение содержания мочевины в крови на 11,9% через 6 месяцев после заражения, а также снижение фракции альбумина на 27,8% и 39,3%, с течением времени, на фоне уменьшения общего белка крови на 35,4% к концу эксперимента. Уменьшение содержания общего белка и альбумина в сыворотке крови также может быть следствием снижения белок синтезирующей функции печени и повышенного распада белка в результате злокачественных новообразований, так как относительно стабильное содержание глюкозы крови свидетельствует о нормальном гормональном статусе поджелудочной железы. Подтверждает данную гипотезу и увеличение содержания

креатинина в сыворотке крови, так как он является продуктом распада белка, который в последствие метаболизируется почками. Снижение активности амилазы крови на 21,3% может быть обусловлено уменьшением содержания глюкозы крови на 18,4% к концу исследования, вероятно, вследствие эндогенной интоксикации, о чем свидетельствует рост активности печеночных ферментов АЛТ и АСТ в 1,4/2,3 и 1,7/3,2, соответственно, на фоне увеличения активности ЛДГ в 1,3 в динамике эксперимента. Рост содержания билирубина в крови в 2,8 и 2,6 раз тоже является маркером нарушения функции гепатобилиарной системы, а также может быть следствием развития гемолитической анемии.

Таблица 4 - Данные биохимического анализа крови потомства крыс

Показатель	Группа животных/возраст			
	F1 контроль / 3 месяца	F1 опыт / 3 месяца	F1 контроль / 6 месяцев	F1 опыт / 6 месяцев
Мочевина, ммоль/л	7,3±0,7	7,4±0,7	7,5±0,7	8,7±0,6*
Креатинин, мкмоль/л	44,6±4,1	69,5±6,7*	46,8±4,7	75,2±7,2*
Глюкоза, ммоль/л	4,2±0,4	3,9±0,4	4,3±0,4	2,1±0,2*
Амилаза, Ед/л	501,7±47,8	485,1±51,2	487,7±45,6	324,2±34,4*
Общий белок, г/л	62,7±5,9	55,3±7,1*	66,1±6,5	46,5±4,8*
Альбумин, г/л	28,8±3,1	23,2±2,1*	30,1±2,8	21,9±3,1*
АЛТ, Ед/л	61,3±6,2	100,1±11,4*	69,8±6,5	135,9±14,2*
АСТ, Ед/л	58,5±6,1	213,3±20,8*	71,4±6,9	262,7±25,1*
Билирубин общ, мкмоль/л	3,1±0,3	6,3±0,6*	2,7±0,2	10,8±1,1*
ЛДГ, Ед/л	505,6±49,1	698,8±72,3*	447,8±45,5	735,1±72,4*

Примечание: * - отличие опытной группы от контрольной ($p \leq 0,05$).

Данные, представленные в таблице 4, свидетельствуют, что у потомства инфицированных *BLV* крыс биохимические показатели крови изменялись в более значительных пределах, чем у их родителей, что

подтверждает наше мнение о том, что у зараженного вирусом лейкоза потомства *BLV*-инфицированных животных признаки заболевания прогрессируют более динамично. В частности, в этой группе животных был отмечен рост показателей креатинина на 55,5% и 60,7% в динамике эксперимента и мочевины на 16% к концу исследования, а уровень общего белка и фракции альбумина были снижены на 13,4%/24,1% и 41,2%/37,4% по сравнению с контролем, соответственно. Содержание глюкозы и активность амилазы крови на конец эксперимента были снижены в 2 и 1,5 раза, соответственно, относительно контроля. Также отмечался рост активности ферментов АЛТ, АСТ и ЛДГ в сыворотке крови животных опытной группы в 1,6/3,6/1,4 и 1,9/3,7/1,6 раз и содержание билирубина в 2 и 4 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

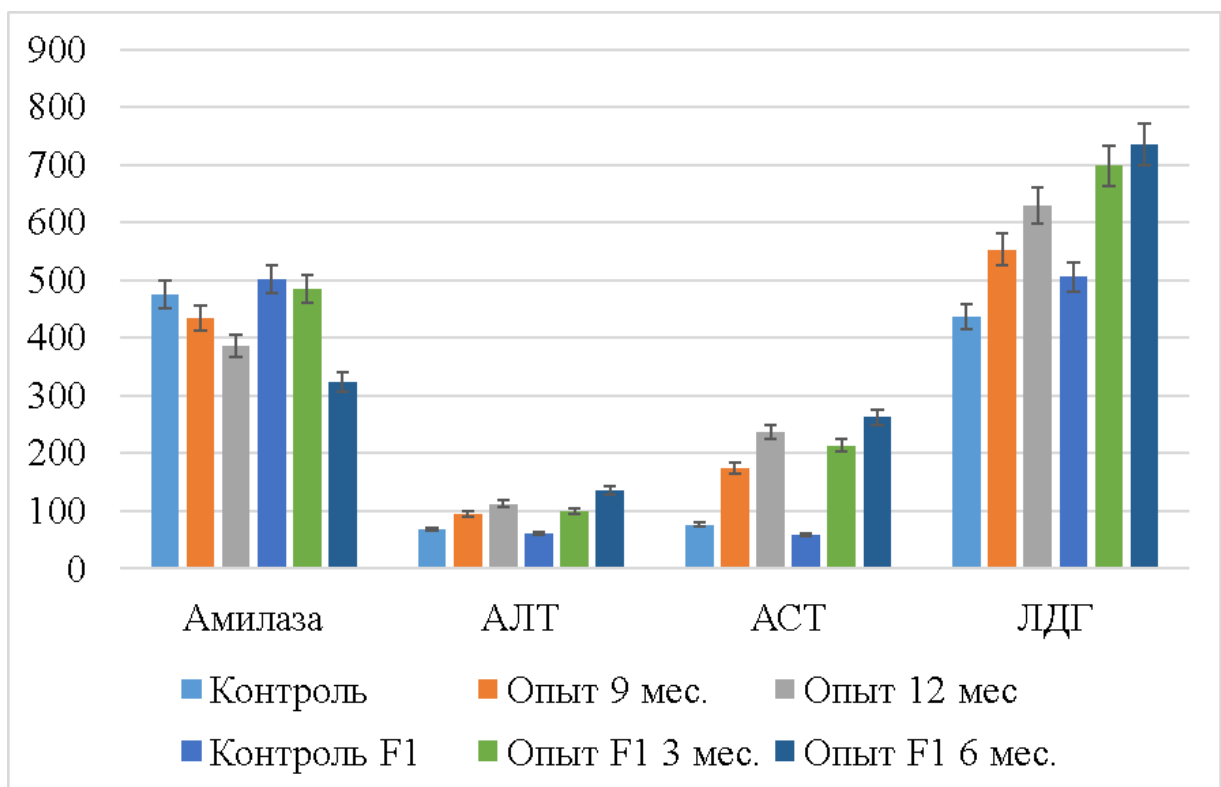


Рисунок 4 – Динамика активности ферментов сыворотки крови крыс, Ед/л.

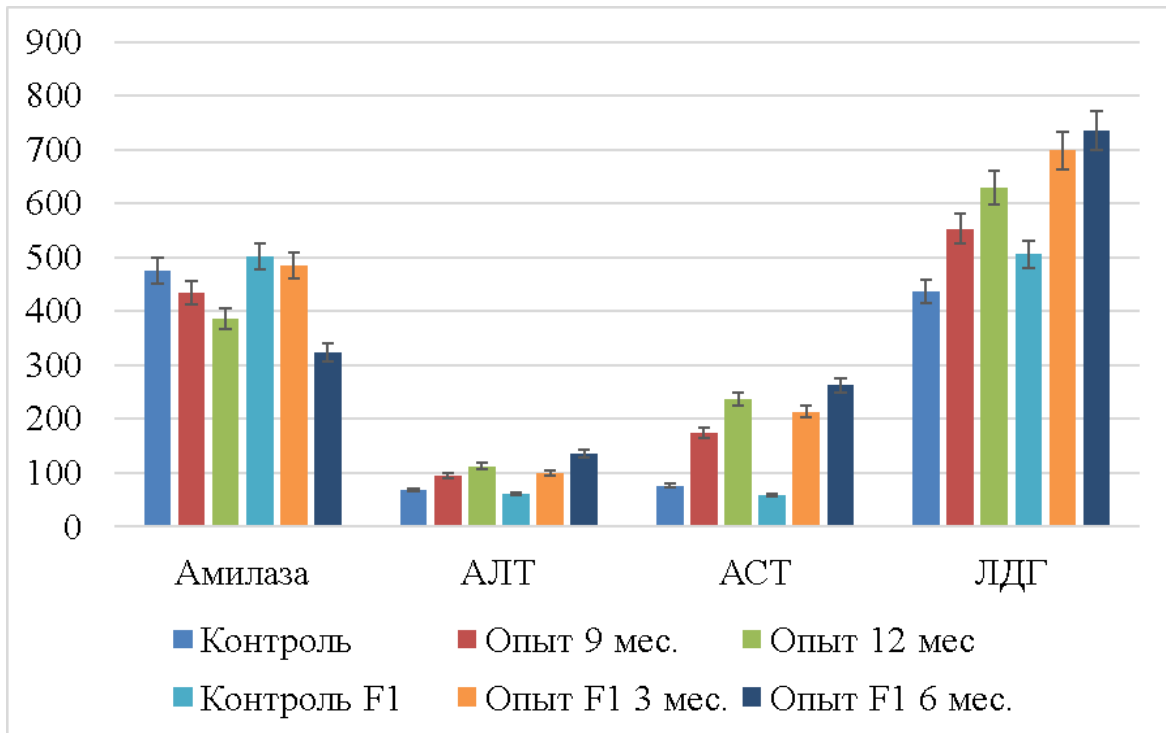


Рисунок 5 – Динамика мочевины (ммоль/л), глюкозы (ммоль/л) и билирубина (мкмоль/л) в сыворотке крови крыс.

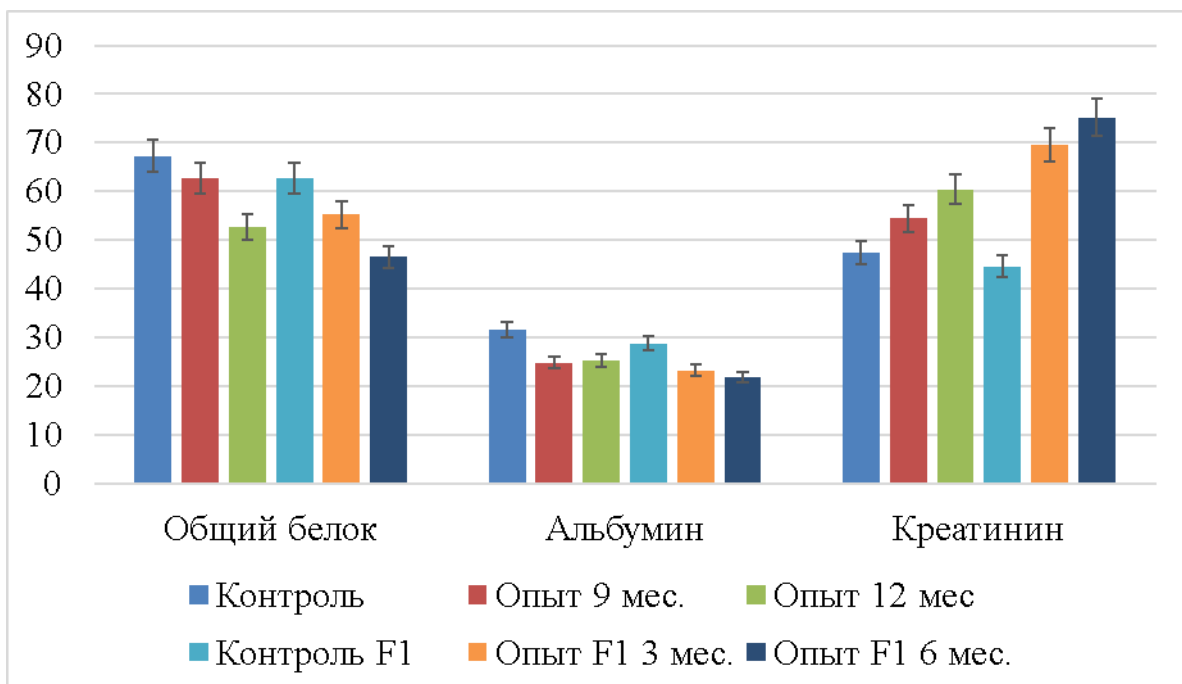


Рисунок 6 – Динамика белковых фракций (г/л) и креатинина (мкмоль/л) в сыворотке крови крыс.

Как проиллюстрировано на рисунке 4, активность печеночных ферментов в сыворотке крови крыс экспериментальных групп закономерно возрастала, динамика же фермента поджелудочной железы была у этих

животных отрицательной относительно контроля. Коррелируют с данными тенденциями отрицательная динамика глюкозы и резко положительная общего билирубина сыворотки крови животных экспериментальных групп относительно контрольных групп, как видно на рисунке 5. Отрицательная динамика белковых фракций и положительная креатинина сыворотки крови, отраженные на рисунке 6, свидетельствуют о преобладании катаболических процессов над анаболическими в организме животных экспериментальных групп.

Таким образом, при сравнительном анализе данных биохимических исследований сыворотки крови крыс нами были выявлены предпосылки развития эндогенной интоксикации у животных опытных групп, характеризующиеся наличием маркеров нарушения деятельности гепатобилиарной системы и фильтрационно-реабсорбционной функции почек, а также признаки развития деструктивных процессов.

Данные выполненных нами ранее биохимических исследований крови крыс, зараженных *BLV* пероральным путем с молоком инфицированных и больных лейкозом коров, позволяют заключить, что при внутрибрюшинном способе заражения, характерные для лейкозной инфекции признаки развиваются у крыс более динамично [150]. Существовали и некоторые отличия, в частности, при пероральной инфекции происходило увеличение показателя белка крови, что может быть связано с высококалорийной диетой животных, однако при этом сохранялась тенденция снижения альбуминовой фракции белка крови при обоих способах инфицирования. При внутрибрюшинной инфекции не было отмечено выраженной динамики содержания глюкозы в сыворотке крови, в отличие от перорального инфицирования крыс.

2.2.2. Динамика цитокинового статуса лабораторных крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции

Следующей нашей задачей стало изучение динамики некоторых гуморальных факторов врожденного и приобретенного иммунитета у лабораторных крыс с экспериментальной *BLV*-инфекцией. С этой целью мы выполнили исследование сыворотки крови экспериментальных животных на содержание $IL-1\beta$ и его антагониста $IL-1Ra$, компонентов $C3$ и $C4$ системы комплемента, протеолитических фрагментов комплемента $C3a$ и $C5a$ и осуществили сравнительный анализ полученных данных в динамике эксперимента через 3 и 6 месяцев после инфицирования экспериментальной группы по отношению к отрицательному контролю.

Наш выбор был обусловлен тем, что данный набор иммунных маркеров позволяет с наименьшими затратами дать многопараметрическую оценку иммунному статусу крыс. $IL-1\beta$ является медиатором острого и хронического воспаления, в норме его концентрация в сыворотке не велика, но она значительно возрастает при многих патологических состояниях. Эту фракцию интерлейкина-1 называют секреторной (α – мембранной), она оказывает опосредованное противоопухолевое действие путем стимуляции продукции $IL-2$ и $INF\gamma$, а также противовирусное через активацию синтеза $INF\beta$ лимфоцитами, является фактором роста Т-лимфоцитов, запускает процесс дифференцировки В-лимфоцитов, то есть обладает многофункциональным провоспалительным фактором. Его активность регулируется продукцией его антагониста $IL-1Ra$, который имеет сродство к рецепторам для $IL-1\beta$ на лимфоцитах, но не обладает провоспалительной активностью. $C4$ компонент системы комплемента запускает иммунологическую реакцию исключительно по классическому пути за счет адсорбции на комплексе АГ-АТ (антиген-антитело). В то время как $C3$ компонент может активировать каскад комплемента как классическим, так и альтернативным путем – напрямую связываясь с поверхностными белками микроорганизмов. Протеолитические фрагменты комплемента $C3a$ и $C5a$

способствуют высвобождению гистамина из тучных клеток и тромбоцитов, что приводит к увеличению проницаемости сосудов, С5а к тому же активирует клетки миелоидного ряда в очаге воспаления, особенно нейтрофилы и моноциты. Их называют анафилатоксинами, так как в большом количестве они могут привести к развитию коллапса и бронхоспазма, что напоминает анафилаксию.

При сравнительном анализе данных иммунологических исследований эталонными считали значения показателей контрольных групп животных. Динамика содержания исследуемых гуморальных факторов иммунитета, ($M \pm m$) в сыворотке крови крыс и их потомства опытной и контрольной групп приведены в таблицах 5 и 6 и проиллюстрированы на рисунке 7.

Таблица 5 - Данные иммунологических исследований взрослых крыс

Показатель	Группа животных/возраст			
	Опыт / 9 месяцев	Контроль / 9 месяцев	Опыт / 12 месяцев	Контроль / 12 месяцев
IL-1 β , пкг/мл	0,105 \pm 0,011*	0,088 \pm 0,009	0,100 \pm 0,011*	0,082 \pm 0,008
IL-1Ra, мкг/мл	0,653 \pm 0,072*	0,320 \pm 0,026	0,496 \pm 0,051*	0,281 \pm 0,029
С3, нг/мл	0,050 \pm 0,006	0,049 \pm 0,005	0,051 \pm 0,005	0,052 \pm 0,004
С4, нг/мл	0,364 \pm 0,029*	0,308 \pm 0,003	0,272 \pm 0,031*	0,312 \pm 0,003
С3а, нг/мл	0,071 \pm 0,008	0,065 \pm 0,005	0,082 \pm 0,010*	0,072 \pm 0,007
С5а, нг/мл	0,245 \pm 0,003*	0,092 \pm 0,011	0,613 \pm 0,059*	0,087 \pm 0,013

Примечание: * - достоверные отличия значений опытной группы от контроля ($P \leq 0,05$)

Как следует из данных, представленных в таблице 5, не все полученные в экспериментальной группе животных данные имели достоверные отличия от показателей группы контроля.

Что касается группы интерлейкинов, содержание IL-1 β у животных экспериментальной группы было на 19 и 22% выше, чем в контроле при первом и втором исследовании, соответственно. Содержание же антагониста IL-1 β , IL-1Ra, отличалось более выраженной динамикой. В экспериментальной группе животных содержание IL-1Ra было в 2 и 1,8 раз выше, чем в контроле при первом и втором исследовании, соответственно.

Это может являться маркером иммуносупрессии у крыс с *BLV*-инфекцией, так как IL-1Ra имеет сродство к рецепторам IL-1 β на иммунокомпетентных клетках, но в отличие от него не обладает провоспалительной активностью. Динамика IL-1Ra показала, что к окончанию эксперимента иммуносупрессия несколько ослабевала, так как содержание IL-1Ra снижалось в 1,3 раз на фоне увеличения IL-1 β .

Содержание фракции C3 системы комплемента не имело достоверных отличий у животных экспериментальной и контрольной групп, в отличие от фракции C4 комплемента, которая характеризовалась выраженной динамикой в эксперименте. Содержание компонента комплемента C4 при первом исследовании сыворотки крови, у животных экспериментальной группы было на 18% выше, чем в контроле, затем снижение этой фракции в динамике эксперимента на 34% привело к тому, что через 6 месяцев с момента заражения содержание фракции C4 было на 15% меньше, чем в контроле. Белки C3 и C4 являются факторами острой фазы воспаления, активирующими иммунную реакцию по альтернативному (C3 и C4) либо классическому (C4) путям. При этом компонент C4 характеризуется тем, что принимает участие в нейтрализации вирусов. Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что в момент заражения и развития виремии происходила активация врожденного противовирусного иммунитета крыс, вероятно вызванная специфическим антителообразованием. После чего инфекция переходила в латентную фазу с элиминацией внеклеточного вируса. Однако низкий титр C3 компонента может быть маркером низкой эффективности фагоцитоза при данной инфекции. Компонент C3 в норме присутствует и подвергается гидролизу специфической конвертазой с низкой интенсивностью в крови, его фрагменты участвуют в обсонировании вирусов и формировании конвертазы, гидролизующей компонент C5 с образованием C5a, что запускает поздние этапы каскада комплемента [73].

Содержание фрагмента протеолиза компонента системы комплемента C3 в начале эксперимента не имело достоверных отличий у животных

опытной и контрольной групп, однако к окончанию эксперимента С3а обнаруживался у крыс экспериментальной группы в большем количестве, чем у контрольной группы животных (на 14%). В динамике продукта протеолиза С5 компонента системы комплемента присутствует более выраженная прогрессия. Содержание С5а фракции в сыворотке крови опытной группы животных уже на момент первого исследования было в 2,7 раз выше, чем в контроле, за 3 месяца наблюдения оно увеличилось еще в 2,5 раза и на момент окончания эксперимента превышало показатели контроля в 7 раз. Протеолитические фрагменты белков комплемента С3а и С5а являются мощными анафилотоксинами - промоутерами острого воспаления, активирующими: нейтрофилы, что приводит к высвобождению вазоактивных молекул; тучные клетки, стимулируя тем самым образование гистамина; клетки эндотелия, провоцируя при этом образование активных форм кислорода [73]. Увеличение их титра является маркером аллергической реакции.

Таблица 6 - Данные иммунологических исследований потомства крыс

Показатель	Группа животных/возраст			
	F1 опыт / 3 месяца	F1 контроль / 3 месяца	F1 опыт / 6 месяцев	F1 контроль / 6 месяцев
IL-1 β , пкг/мл	0,091 \pm 0,011	0,087 \pm 0,008	0,097 \pm 0,011	0,089 \pm 0,009
IL-1Ra, мкг/мл	0,464 \pm 0,042*	0,169 \pm 0,015	0,806 \pm 0,082*	0,172 \pm 0,018
С3, нг/мл	0,047 \pm 0,004	0,050 \pm 0,005	0,049 \pm 0,005	0,052 \pm 0,004
С4, нг/мл	0,279 \pm 0,031	0,306 \pm 0,009	0,359 \pm 0,038*	0,309 \pm 0,011
С3а, нг/мл	0,076 \pm 0,007*	0,066 \pm 0,007	0,075 \pm 0,009*	0,064 \pm 0,006
С5а, нг/мл	0,122 \pm 0,011*	0,106 \pm 0,009	0,131 \pm 0,059*	0,112 \pm 0,011

Примечание: * - достоверные отличия значений опытной группы от контроля ($P \leq 0,05$)

Как следует из данных, представленных в таблице 6, содержание IL-1 β у потомства инфицированных крыс, хотя несколько и возрастало в динамике эксперимента, не имело достоверных отличий от животных контрольной группы. Динамика же его антагониста, IL-1Ra, была резко положительной: уже на первом этапе исследования содержание ингибитора

превышало в 2,7 раз содержание промотора воспалительной реакции; при втором исследовании показатель IL-1Ra возрос в 1,7 раз, превышая значения контрольной группы уже в 4,7 раз. Это позволяет нам судить о прогрессирующей иммунной супрессии у потомства *BLV*-инфицированных крыс.

Динамика компонента C4 системы комплемента у потомства инфицированных крыс носила несколько иной характер, чем у их родителей: его титр не снижался, а напротив, возрастал с течением времени - на 14% по сравнению с контролем и на 29% в динамике эксперимента. Активация классического пути системы комплемента свидетельствует о процессе антителообразования в организме животных. При этом содержание C3 компонента не имело достоверных отличий от контроля, что может быть маркером низкой эффективности фагоцитоза.

Значения показателей протеолитических фрагментов C3a и C5a синхронно были выше в экспериментальной группе животных на 15% и 17% в динамике эксперимента. Это может быть маркером стойкого аллергического состояния у потомства *BLV*-инфицированных крыс.

Полученные нами данные относительно иммунологического дисбаланса при лейкозе у крыс находятся в определенной корреляции с результатами исследований иммунологического статуса при *BLV*-инфекции, представленные в литературных источниках. В частности, M.C. Frie & P.M. Coussens (2015) установили, что в лимфоцитах инфицированных животных снижается продукция IL2, IL4, IL10 и FNO α на фоне увеличения образования IL12p40 и значительного роста IL6 [114]. S. Konnai et al. (2003) при анализе таких показателей иммунной регуляции, как экспрессия IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40 и IFN- γ митоген-стимулированными лимфоцитами крови, выделенными от *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота, показывают, что у животных с алейкемичной формой заболевания средний уровень экспрессии IFN- γ и IL-12 значительно выше по сравнению с животными с персистентным лимфоцитозом, в то время как

существенных различий в экспрессии IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10 не наблюдается [152].

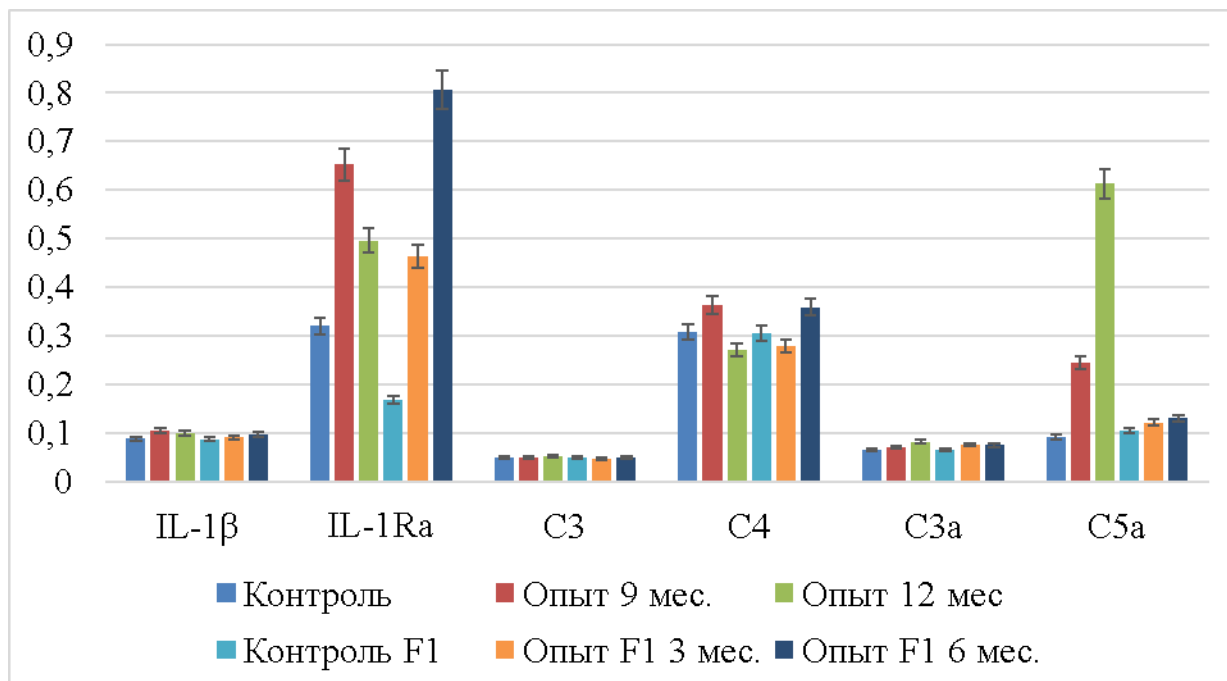


Рисунок 7 – Динамика цитокинов в сыворотке крови крыс: IL-1 β (пкг/мл), IL-1Ra (мкг/мл), C3(нг/мл), C4 (нг/мл), C3a (нг/мл) и C5a (нг/мл).

Как показано на рисунке 7, наиболее динамичными в цитокиновом статусе крыс были IL-1Ra, C4 компонент комплемента и C5a протеолитический фрагмент системы комплемента. Причем стойкой положительной динамикой отличался только C5a фрагмент. Динамика IL-1Ra и фракции C4 была диаметрально противоположной у взрослых крыс экспериментальной группы и их потомства в сравнении с контролем, что свидетельствует о различном направлении развития иммунной реакции.

Результаты наших исследований совпадают с мнением А. Abdelbaset-Ismail et all. (2017), показавших, что у пациентов с лейкемией / лимфомой происходит активация системы комплемента и высвобождение фрагментов расщепления C3 и C5, следствием чего является повышение подвижности злокачественных клеток и их экспансия в инфицированном организме [74]. Этот факт представляет собой угрозу злокачественной пролиферации, так как повышенная концентрация C5a коррелирует с высоким метастатическим потенциалом при некоторых видах рака [98].

Наши исследования показали, что у потомства *BLV*-инфицированных животных иммунологические изменения характеризуются ярко выраженными признаками иммунной супрессии и умеренным, но стойким присутствием аллергических маркеров. У родительского поголовья иммуносупрессия носит частично компенсаторный характер, однако имеются предпосылки развития выраженной аллергической реакции. Можно предположить, что встреча с возбудителем во внутриутробном и неонатальном периоде приводит к возникновению своего рода иммунной толерантности к возбудителю, а модифицированные вирусом клетки стимулируют выработку в лимфоцитах именно тех медиаторов, которые способствуют пролиферации опухолевых клеток и экспансии провируса в зараженном организме.

Лейкозная инфекция у крупного рогатого скота характеризуется циклическим течением, периоды усиления и торможения иммунного ответа сменяют друг друга [59]. То же мы наблюдаем в и организме инфицированных вирусом энзоотического лейкоза крыс.

Резюмируя все выше сказанное, необходимо отметить, что нами получены принципиально новые сведения, позволяющие дать оценку динамике иммунного статуса при *BLV*-инфекции у животных, коррелирующие с мнением, как отечественных, так и зарубежных исследователей. Анализ полученных данных позволяет нам сделать вывод, что развитие *BLV*-инфекции у лабораторных крыс линии Wistar сопровождается активацией классического пути иммунной реакции, детерминированного в большей мере С4 компонентом комплемента. При этом процессы торможения преобладают в иммуногенезе, и особенно это выражено у потомства инфицированных крыс. Лейкозная инфекция у крыс линии Wistar характеризуется иммунобиологическими процессами, приводящими к изменению нормальной иммунной реактивности организма с развитием стойкого аллергического состояния. Выявленные нами гуморальные маркеры иммунитета указывают на то, что *BLV*-

инфицированные лабораторные крысы имеют тенденцию к злокачественной пролиферации гемобластозных клеток.

Полученные нами данные создают предпосылки для дальнейшего изучения гуморальных факторов иммунитета при *BLV*-инфекции с использованием лабораторных крыс в качестве биологической модели.

2.2.3. Разработка нового способа моделирования *BLV*-инфекции

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота относят к вирусным инфекциям. Однако установлено, что заражение ЭЛ КРС происходит чаще всего не вирусом, а инфицированным лимфоцитом, геном которого, содержит интегрированную в хромосому провирусную ДНК [25].

В последние годы появляется все больше сообщений об увеличивающемся генетическом разнообразии *BLV*, его способности расширять спектр своего тропизма *in vivo*. В частности, в работах G.C. Buehring et al. (2014, 2015, 2017) представлены доказательства того, что *BLV* может быть связан с развитием рака молочной железы у женщин [85, 109]. 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 [38]. К Boris-Lawrie et al. (1997) было показано, что вирус-продуцирующие клетки и провирусная ДНК являются инфекционными и иммуногенными для лабораторных крыс [121].

Лабораторные крысы линии Wistar служат популярной лабораторной моделью для осуществления большого количества научных исследований и выполнения рутинных работ, так как позволяют в кратчайшие сроки с минимальными затратами выполнить многопараметрический анализ на нескольких генерациях животных [19, 61]. Наши предварительные исследования показали, что данная лабораторная модель является адекватной при *in vivo* изучении *BLV*-инфекции [150]. Для экспериментального воспроизведения *BLV*-инфекции на лабораторных крысах мы использовали пероральный способ заражения молоком *BLV*-инфицированных коров. Этот способ показал свою эффективность, однако при исследовании клинико-морфологических и биохимических параметров крови лабораторных животных, в значительном количестве у них были выявлены маркеры наличия состояния аллергоза [17, 21]. При исследовании

гемато-биохимического статуса *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота они присутствовали в меньшем количестве [31, 78]. Известно, что молоко инфицированных лейкозом коров является низкокачественным сырьем [15, 44], и его постоянное использование в пищу представляет собой опасность для организма [29]. Данный факт и представленные в подпунктах 2.2.1 и 2.2.2 результаты исследований послужил предпосылкой для разработки нового способа заражения лабораторных крыс при экспериментальном воспроизведении *BLV*-инфекции.

Таким образом, перед нами встала задача, заключающаяся в разработке способа получения биологически чистого концентрата, содержащего инфекционную форму возбудителя ЭЛ КРС и применения его для моделирования *BLV*-инфекции у лабораторных животных с последующим контролем заражения.

По результатам наших разработок была сформирована заявка на патент РФ на изобретение (№ 2019110652 от 10.04.2019). Данное изобретение относится к области экспериментальной медицины и может быть использовано для моделирования *BLV*-инфекции на лабораторных животных с целью изучения механизмов развития инфекционного процесса и возможности управления им.

Первым этапом при реализации поставленной перед нами задачи стал анализ ресурсов ФИПС на наличие запатентованного способа получения инфицирующего материала и способа его введения лабораторным животным. В результате патентного поиска были обнаружены три аналога, близких по смыслу к разрабатываемому нами способу и один прототип, используемый в последствие для оформления патента.

В качестве первого аналога выступил способ заражения экспериментальных животных бластоцистами, заключающийся в том, что лабораторным мышам и крысам через рот однократно вводили взвесь вакуолярных форм бластоцист человека в объеме 0,5-1,0 мл в концентрации 10^6 - 10^7 /мл, полученную из фекалий путем обогащения и последующего

фильтрации полученной взвеси через мембрану (заявка № 2002114890/13, опубликовано 10.02.2004). Данный способ, несомненно, поможет избежать состояния интоксикации в результате длительного употребления молока больных лейкозом коров. Но он не может быть использован для воспроизведения *BLV*-инфекции путем однократного перорального заражения крыс, так как алиментарный способ заражения возбудителем ЭЛ КРС является эффективным при значительно более длительном выпаивании экспериментальным животным вирусосодержащего материала, например 2 раза в день в течение 30 дней [38].

Вторым аналогом послужил способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных, заключающийся в том, что на кишечную микрофлору воздействуют антибактериальным препаратом гентамицином и определяют количество жизнеспособных микроорганизмов кишечной микрофлоры в начале и конце опыта. Затем сравнивают численные значения содержания микроорганизмов. При этом создают селективное давление антибактериальным препаратом гентамицином при пероральном его введении лабораторным животным 1 раз в сутки в течение 5 дней в дозах, превышающих его суточную терапевтическую дозу при парентеральном введении в 4,8 раза у мышей и в 4 раза - у морских свинок (заявка № 2011149501/14, опубликовано 20.03.2013 Бюл. № 8). Несмотря на то, что данный способ является достаточно физиологичным и не предполагает введение посторонних антигенов в организм, его принцип не может быть использован для моделирования *BLV*-инфекции у лабораторных животных, так как возбудитель ЭЛ КРС не является представителем резидентной микрофлоры крыс и воспроизведение заболевания не возможно путем управления гомеостазом по средствам лекарственных препаратов, воздействующих на микробиоценоз.

Третий аналог - способ моделирования перитонита, предполагающий введение в брюшную полость животного микробной взвеси *E. coli* и *B. fragilis*, был близок к нашей тематике тем, что в качестве

экспериментальных животных при его воспроизведении используют самцов крыс линии Wistar в возрасте 6-9 месяцев. Недостатком данного способа, не позволяющим использовать его для решения нашей задачи является его трудоемкость и сложность исполнения. Крысам выполняют лапаротомию, в рану выводят слепую кишку и в бессосудистой зоне области купола слепой кишки проводят разрез серозно-мышечной оболочки длиной до 1 см, затем рану кишки ушивают непрерывным обвивным швом, после чего в брюшную полость вводят взвесь *E. coli* и *B. fragilis*, содержащую по 0,5 мл 10^9 микробных тел каждого, и лапаротомную рану ушивают (заявка № 2019109595, опубликовано 11.03.2020 Бюл. № 8). При воспроизведении подобной методики существует большая вероятность развития осложнений. Кроме того, у экспериментальных животных, очевидно, будет длительный реабилитационный период.

Наиболее близким к нашему изобретению оказался способ моделирования кишечного иерсиниоза у экспериментальных животных, включающий следующие стадии:

1) штамм *Yersinia enterocolitica* выращивают при температуре 24-26°C на агаре Хоттингера;

2) готовят 3 млрд взвесь полученной культуры в хлориде натрия, которую соединяют в соотношении 1:1 с 0,2% раствором агара Нобля;

3) вводят морским свинкам внутрибрюшинно взвесь в объеме 0,5 мл, которая содержит 3×10^8 микробных клеток *Y. enterocolitica* в агаризованном растворе хлорида натрия;

4) животных забивают через пять дней, вскрывают, делают мазки-отпечатки из брызжеечных лимфоузлов и выделяют из них пассированную культуру;

5) перед заражением экспериментальных животных проводят снижение кислотности их желудочного сока путем перорального введения 7,5% раствора пищевой соды, белым мышам - 0,1 мл, морским свинкам - 0,5 мл;

б) заражают опытных животных пассированной культурой *Y. enterocolitica* перорально, причем белым мышам вводят 3×10^9 микробных клеток, разведенных в 0,2 мл физиологического раствора, а морским свинкам - 3×10^9 микробных клеток, разведенных в 0,5 мл физиологического раствора;

7) подтверждают кишечный иерсиниоз методом ПЦР после высева из внутренних органов животных на агар Хоттингера с рН 7,2 (заявка № 2014132726/14, опубликовано 20.10.2015 Бюл. № 29).

Недостатками данного способа, не позволяющими использовать его для решения поставленной перед нами задачи, являются:

- затраты на культивирование возбудителя в лабораторных условиях для обогащения заразного материала;
- использование перорального способа инфицирования животных с предварительным снижением кислотности их желудочного сока;
- необходимость выводить животных из эксперимента с целью контроля факта их заражения;
- потребность во вскрытии лабораторных животных для подтверждения диагноза;
- применение культурального метода контроля факта заражения лабораторных животных.

Так как поставленная перед нами задача заключалась в создании доступного по материально-техническому обеспечению, малоинвазивного, быстро воспроизводимого, высокоэффективного, легко контролируемого способа моделирования *BLV*-инфекции у экспериментальных животных, нами был разработан свой, уникальный подход к ее решению.

Для этого, свежеполученную стерильную стабилизированную КЗ ЭДТА цельную кровь *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота мы центрифугировали на 1000 об/мин при 25°C в течение 10 минут. Затем отбирали стерильным шприцем образовавшееся между плазмой и эритроцитами кольцо монунуклеаров и *ex tempore* вводили полученную

фракцию моноклеаров, разведенную стерильным физиологическим раствором по стандарту мутности МакФарланда (R092В стандарт 1 ед.), в объеме 0,5 мл внутривенно 5-6-и месячным крысам линии Wistar двукратно с интервалом в 1 неделю. Контроль заражения осуществляют методом ПЦР с кровью экспериментальных животных.

Предлагаемый способ моделирования *BLV*-инфекции у экспериментальных животных обеспечивает возможность высокоэффективно воспроизводить и достаточно просто контролировать заражение крыс линии Wistar возбудителем ЭЛ КРС и отличается от других существующих методов тем, что является:

- низко затратным, так как не требует специального оборудования и дорогостоящих реактивов для накопления биомассы возбудителя инфекции;

- мало инвазивным, так как отсутствует необходимость выполнения полостных операций для заражения животных;

- быстро воспроизводимым, так как предполагает парентеральный путь инфицирования животных без специальной предварительной подготовки их к заражению;

- обеспечивающим высокую сохранность поголовья экспериментальных животных, так как нет необходимости выводить животных из эксперимента с целью контроля факта их заражения;

- легко контролируемым, так как эффективность заражения подтверждается методом ПЦР с кровью лабораторных животных.

При апробации эффективности разработанного нами способа моделирования *BLV*-инфекции у экспериментальных животных 5-6 месячным крысам линии Wistar (n=20) вводили взвесь лимфоцитов по разработанной нами схеме, а контрольной группе животных (n=10) вводили аналогичное количество физиологического раствора. Кровь у экспериментальных крыс отбирали из латеральной хвостовой вены через неделю после повторного введения лимфоцитов. Наличие *BLV*-инфекции у крыс опытной группы устанавливали методом ПЦР на оборудовании Bio-

Rad (USA) с использованием набора Лейкоз (ИЛС, Россия). По результатам ПЦР исследований 100% животных экспериментальной группы были инфицированы *BLV*. В то время как все животные контрольной группы были *BLV*-негативны.

Для апробации эффективности разработанного нами способа с целью изучения механизмов развития инфекционного процесса, у экспериментальных животных выполняли клинико-морфологический и биохимический анализы крови. Детальный анализ полученных данных представлен в соответствующей главе диссертационной работы. В целом можно отметить, что общий анализ крови крыс выявил выраженный в той или иной степени лимфолейкоз у 75% животных опытной группы и лейкоцитоз со сдвигом нейтрофильного ядра влево. Количество лимфоцитов крови крыс опытной группы было на 17-36% больше, чем у животных контрольной группы, лейкоцитов – в среднем на 30%, при этом количество сегментоядерных нейтрофилов возрастало в среднем на 39%. У животных опытной группы присутствовали признаки эритроцитарной аплазии, гемолитической или апластической анемии. У отдельных животных отмечали маркеры аллергии. При биохимическом исследовании крови крыс опытной группы было выявлено снижение общего белка у животных в среднем на 9%, при этом уровень альбуминовой фракции снижался наиболее значительно – на 24-25% по сравнению с контрольной группой. Кроме того, у некоторых крыс опытной группы несколько возрастали содержание креатинина и активность аминотрансфераз в сыворотке крови. Через 6 месяцев после заражения было выявлено повышение содержания билирубина в крови крыс опытной группы в 2,7-3,2 раз по сравнению с контролем. А также значительное увеличение содержания не только креатинина, но и мочевины крови. На фоне роста активности печеночных ферментов было отмечено увеличение коэффициента де Ритиса (в 3-5 раз). Данные изменения являются

характерными при развитии лейкозной инфекции у животных, что позволяет нам судить об адекватности полученных результатов.

Таким образом, разработанный нами способ воспроизведения экспериментальной *BLV*-инфекции на лабораторных животных является не дорогостоящим и доступным в материально-техническом отношении методом, отличающимся низкой травматичностью для экспериментальных объектов, легко воспроизводимым и высокоэффективным, позволяющим достигнуть желаемого результата в короткие сроки. При этом контроль заражения показывает, что инфекция воспроизводится у 100% экспериментального поголовья и сопровождается характерными для *BLV* изменениями в крови животных, что позволяет рекомендовать разрабатываемый способ для изучения механизмов развития инфекционного процесса и возможности управления им.

2.2.4. Цитологические изменения в селезенке крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции

Цитологическими исследованиями мазков-отпечатков селезенки *BLV*-инфицированных крыс было выявлено присутствие нескольких видов патологических и атипичных клеток различного происхождения. Среди них клетки крови и атипичные клетки иного происхождения, что иллюстрируют рисунки 8 – 12.

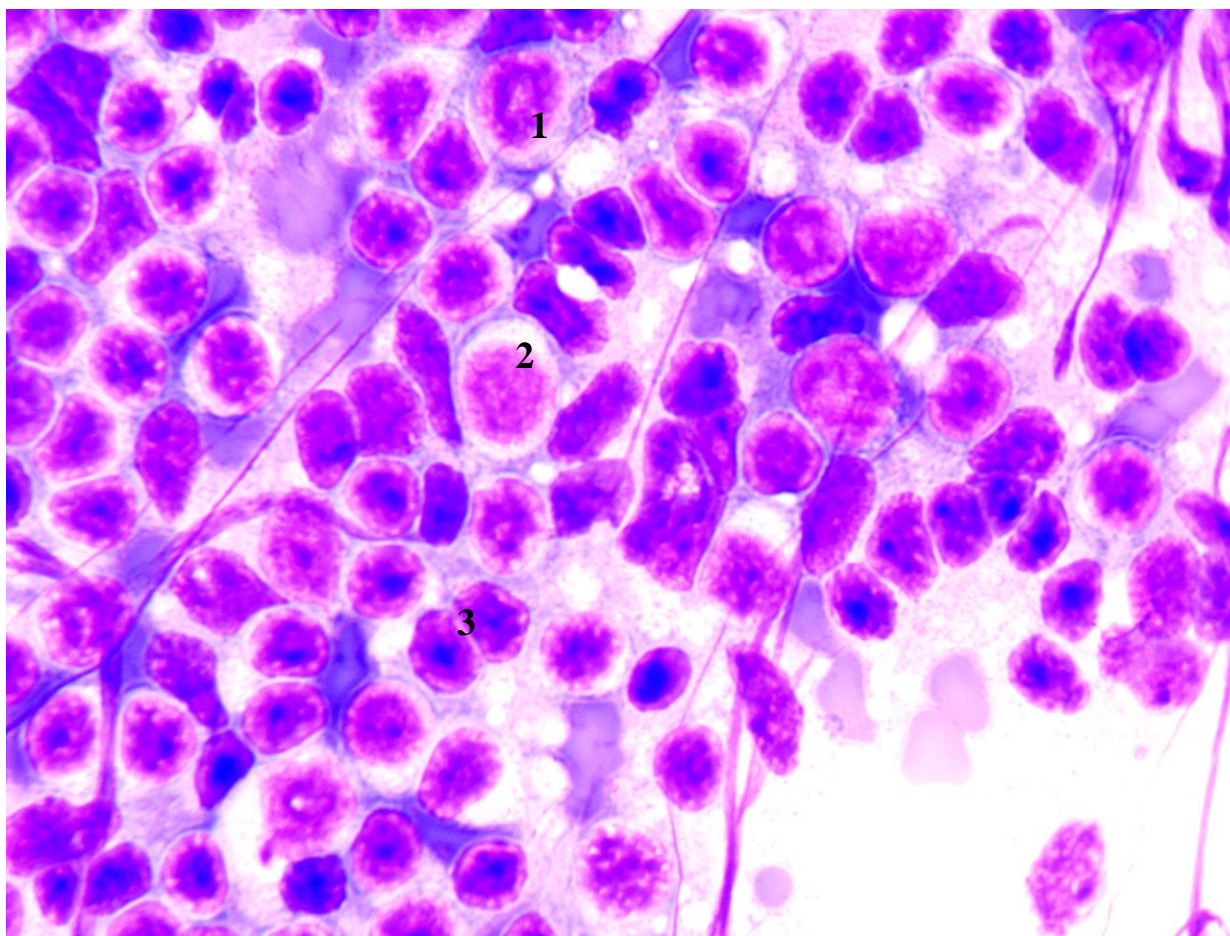


Рисунок 8 - Патологические формы клеток крови: миелобласт (1), атипичный промиелоцит (2), реактивные лимфоциты (3).

Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

Миелобласты характеризуются нежно-петлистым мелкосетчатым строением хроматина с равномерным калибром и окраской нитей (напоминает «сетку капронового чулка»). Цитоплазма базофильная, ядерно-цитоплазматическое соотношение высокое. В ядре встречаются нуклеолы. Атипичные промиелоциты имеют крупные размеры, ядра часто имеют

лопасти, двудольчатые, нередко почкообразной формы. Цитоплазма содержит крупную розово-пурпурную зернистость. Реактивные лимфоциты (бласттрансформированные) имеют ядро неправильной, чаще треугольной формы, неравномерно окрашенный хроматин с четко выраженными ядрышками. Такие клетки могут присутствовать в крови и в норме, но в небольшом количестве. Присутствие их более 10% наблюдается при различных патологических состояниях, таких как инфекционный мононуклеоз и другие вирусные инфекции, онкологические и аутоиммунные заболевания.

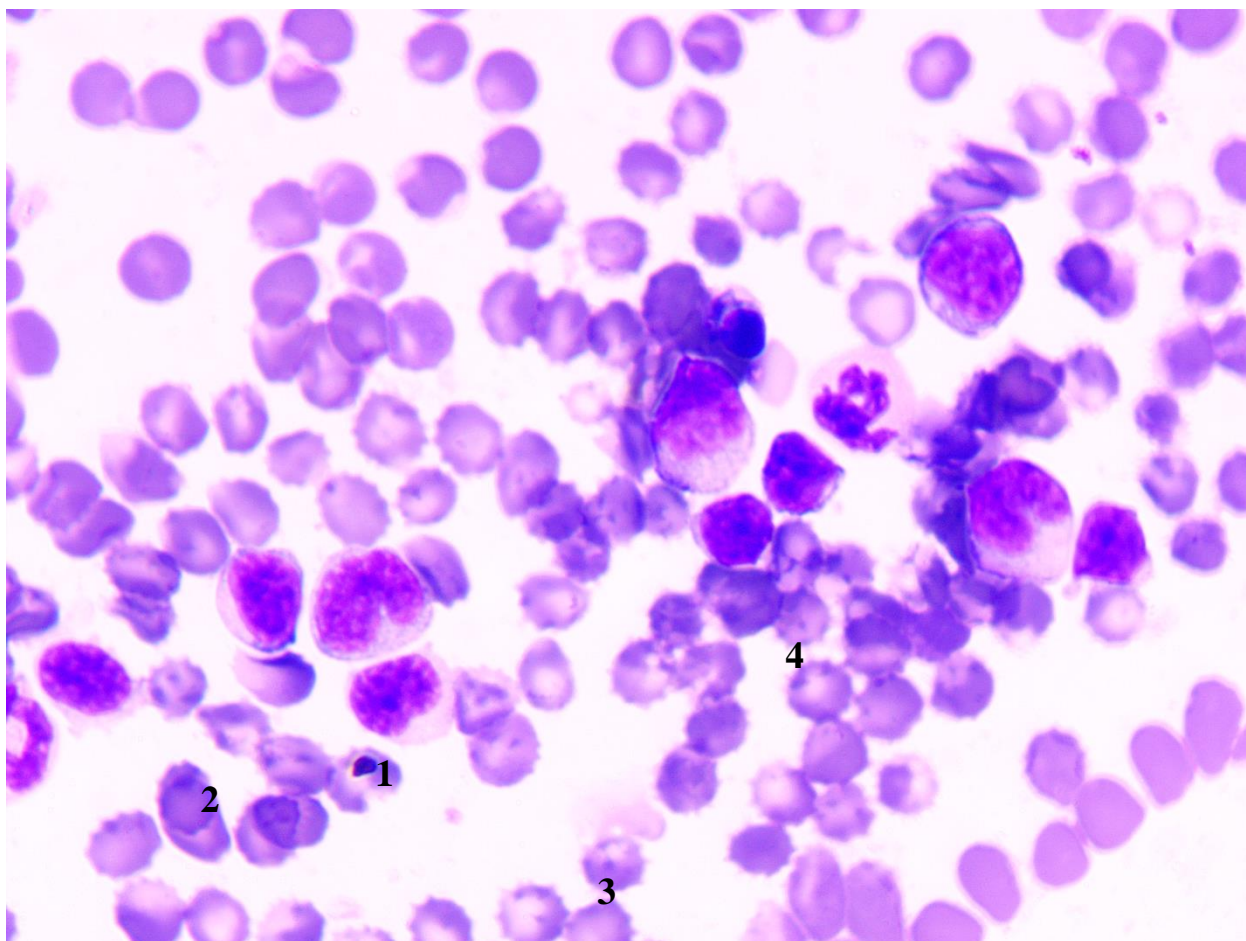


Рисунок 9 - Патологические формы эритроцитов: Тельца Кебо (1), Жоли (2) и Папенгеймера (3), «изъеденные» края (4).

Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

Тельца Папенгеймера – фиолетовые агрегаты ферритина, являются маркером сидеробластной анемии или миелодиспластического синдрома,

развивающегося при нарушенной утилизации железа в костном мозге со снижением синтеза гема. Тельца Кебо представляют собой кольцевидные включения, являющиеся остатками ядерной мембраны, также являются проявлением миелодиспластического синдрома. Тельца Жолли имеют вид мелких округлых темно-фиолетовых включений, встречаются по 1 (реже по 2 - 3) в эритроците. Представляют собой остатки ядра, являются маркером мегалобластной анемии при миелодиспластическом синдроме. Эритроциты с «изъеденными» краями появляются при аутоиммунных процессах, при повреждении мембраны клетки антителами, что является косвенным признаком гемолитической анемии.

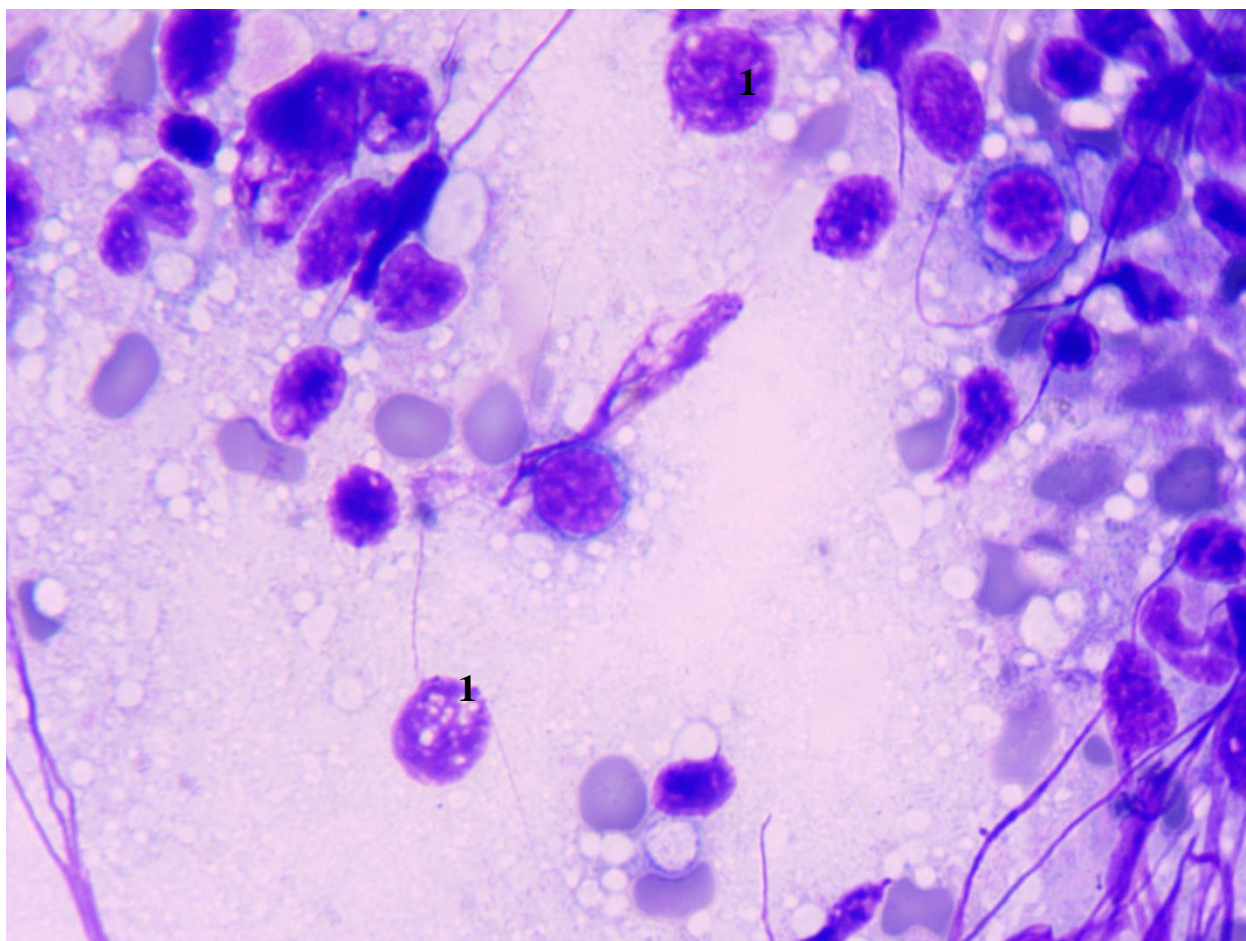


Рисунок 10 - Опухолевые «беркиттоподобные» клетки (1).

Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

Характерной для лейкоза формой бластных клеток является присутствие «беркиттоподобных» клеток, имеющих темно синюю цитоплазму, часто обильно вакуолизированную.

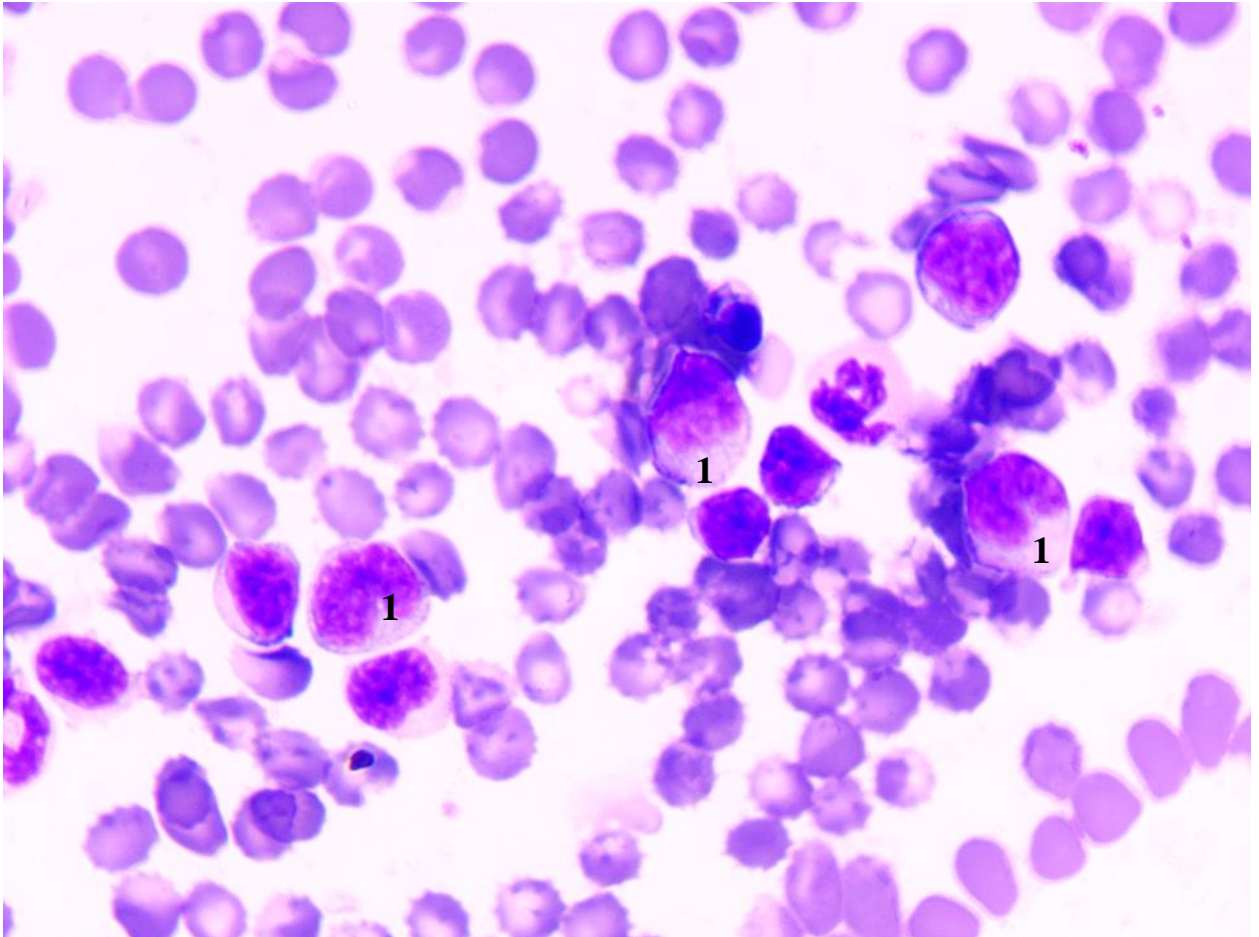


Рисунок 11 - Опухолевые формы лимфоцитов (1).

Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

Опухолевые формы лимфоцитов имеют высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, складчатые ядра с 1 ли 2 вдавлениями и слабо базофильной цитоплазмой.

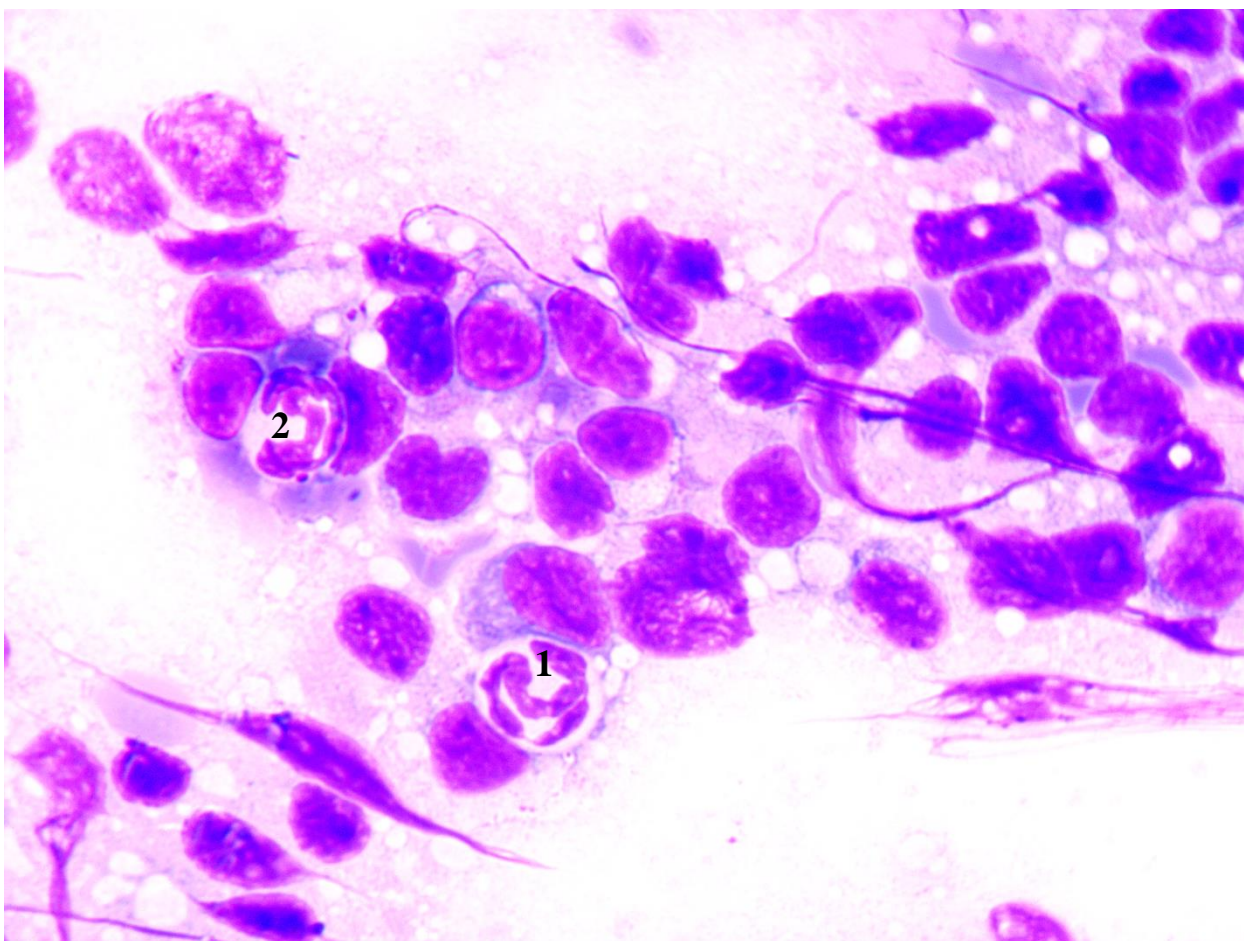


Рисунок 12 – Патологические формы нейтрофилов: агранулярный (1), с нарушенной сегментацией (2). Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

Гипогранулярные нейтрофилы, вплоть до полного отсутствия в них гранул, со светло-серой цитоплазмой, появляются при миелопролиферативных заболеваниях. Гипосегментация, являющаяся признаком нарушенного созревания клеток, проявляется наличием шнуровидного ядра в клетках.

Комплексная оценка цитограммы мазков-отпечатков селезенки позволила выявить присутствие в органе признаки таких патологических состояний, как гиперплазия, мастоцитоз, аденокарцинома и фибросаркома селезенки, что иллюстрируют рисунки 13-16.

При гиперплазии селезенки в цитограмме на фоне базофильного межклеточного вещества и клеток воспаления (нейтрофилов), эозинофилов обнаружены зрелые лимфоциты, лимфобласты, центробласты, центроциты,

а также плазматические клетки, мастоциты и гистиоциты. Клеток опухолевого роста в исследуемом материале не обнаружено (рис. 13).

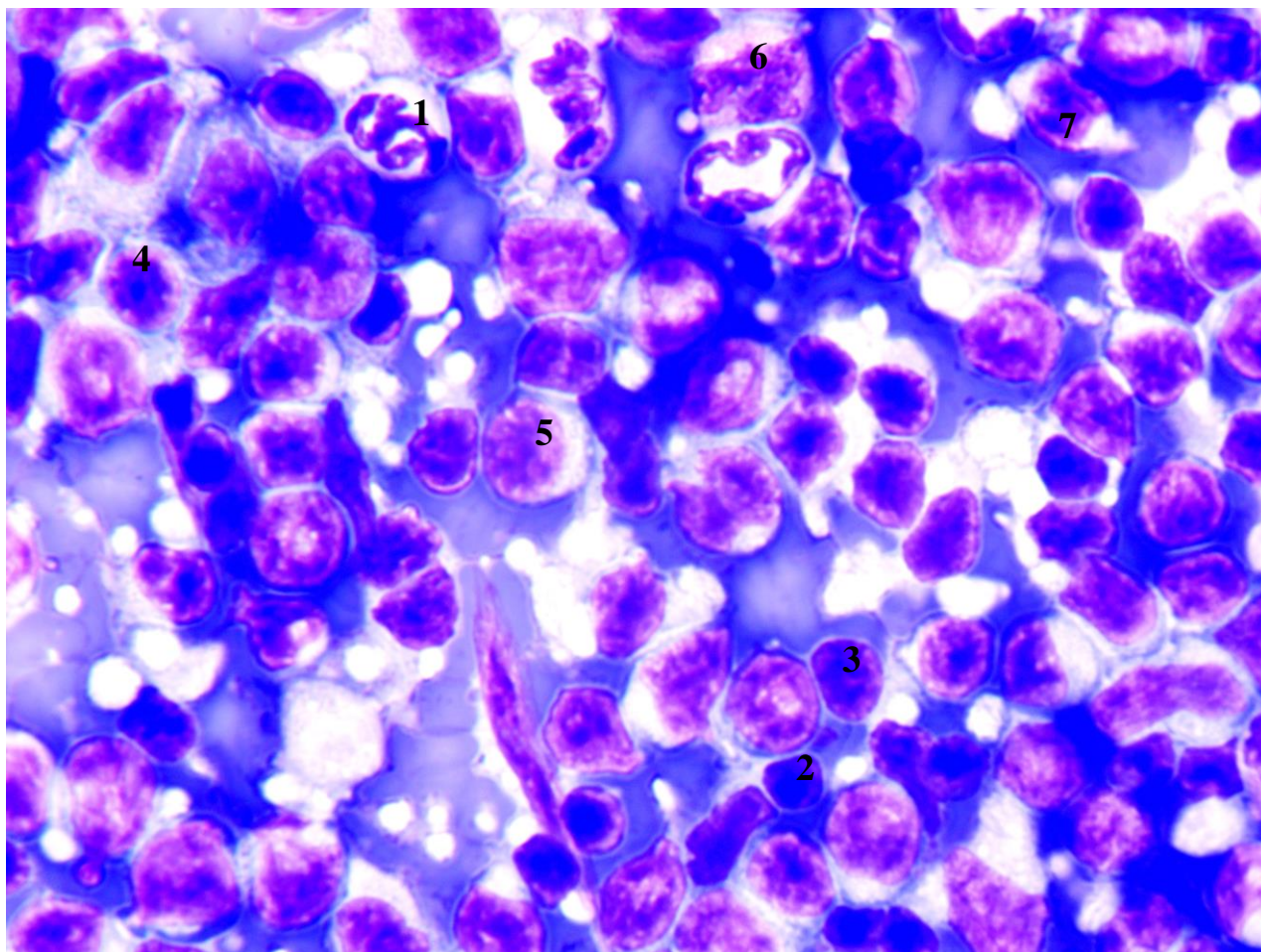


Рисунок 13 - Цитологическая картина гиперплазии селезенки: нейтрофил (1), лимфоцит (2), центробласт (3), центроцит (4), плазматическая клетка (5), мастоцит (6) и гистиоцит (7). Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

Зрелые лимфоциты – мелкие клетки округлой формы, содержащие округлые ядра без ядрышек. Ядерная оболочка ровная, неутолщенная. Хроматин грубый, глыбчатый, темнобазофильный. Цитоплазма скудная, базофильная. Лимфобласты и центробласты (малые и крупные клетки с нерасщепленными ядрами). Мелкие и крупные лимфоциты округлой формы, содержащие округлые ядра с ровным контуром. Хроматин мелкозернистый, равномерно распределенный, наблюдаются мелкие ядрышки. Цитоплазма скудная, базофильная. Центроциты – крупные и мелкие клетки с расщепленными ядрами. Клетки округлые. Ядра овальной и

округлой формы с вдавлениями. Ядерная оболочка расщеплена, неутолщенная. Хроматин грубый с мелкими ядрышками. Цитоплазма слабобазофильного цвета. Плазматические клетки – крупные и средние клетки, содержащие округлые эксцентрично расположенные ядра. Хроматин мелкозернистый, неравномерно распределенный. Цитоплазма умеренная, базофильная. Имеется перинуклеарная зона просветления. Мастоциты - крупные и мелкие клетки, округлой формы, содержащие азурофильные цитоплазматические гранулы. Гистиоциты – крупные и средние клетки, полигональной формы. Ядра овальные, эксцентрично расположенные. Ядерная оболочка ровная, неутолщенная. Хроматин равномерно распределенный, крупнозернистый, базофильный. Цитоплазма обильная, базофильная, содержащая фагоцитированные фрагменты ядер.

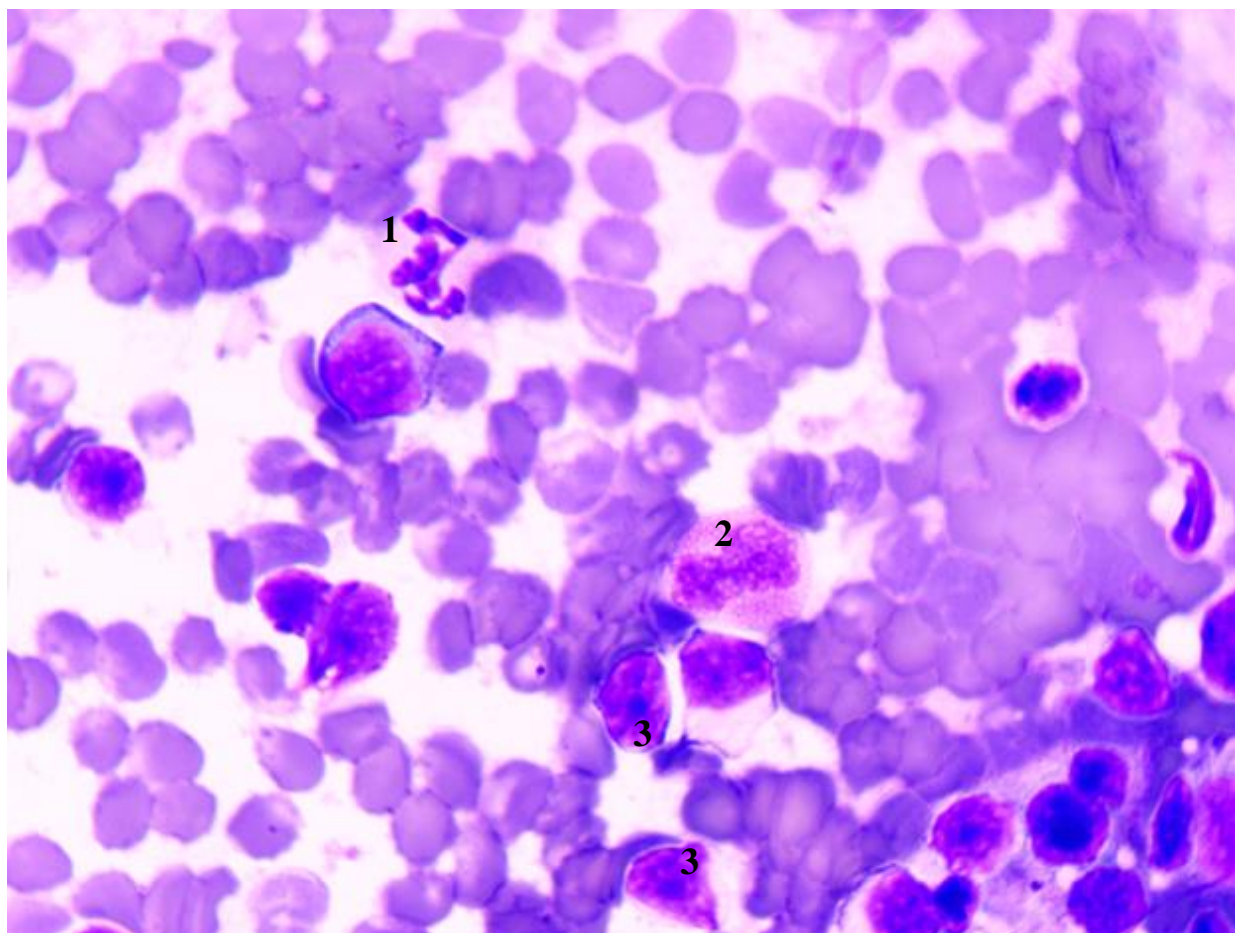


Рисунок 14 - Цитологическая картина аденокарциномы селезенки: клетки воспаления (нейтрофил – 1 и эозинофил – 2), атипичные клетки (3).

Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

В цитограмме на фоне клеток воспаления обнаружены атипичные клетки эпителиального происхождения с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Клетки располагаются скоплениями. Клетки крупные и средние, округлой и овальной формы. Ядра клеток располагаются эксцентрично. Ядра крупные и мелкие, вытянутой и полигональной формы. Ядерная оболочка неровная, утолщенная. Хроматин неравномерно распределенный, базофильный, мелкозернистый. Ядра содержат 1-2 увеличенных ядрышка. Цитоплазма умеренная, слабобазофильная, вакуолизированная. Наблюдается двуядерность.

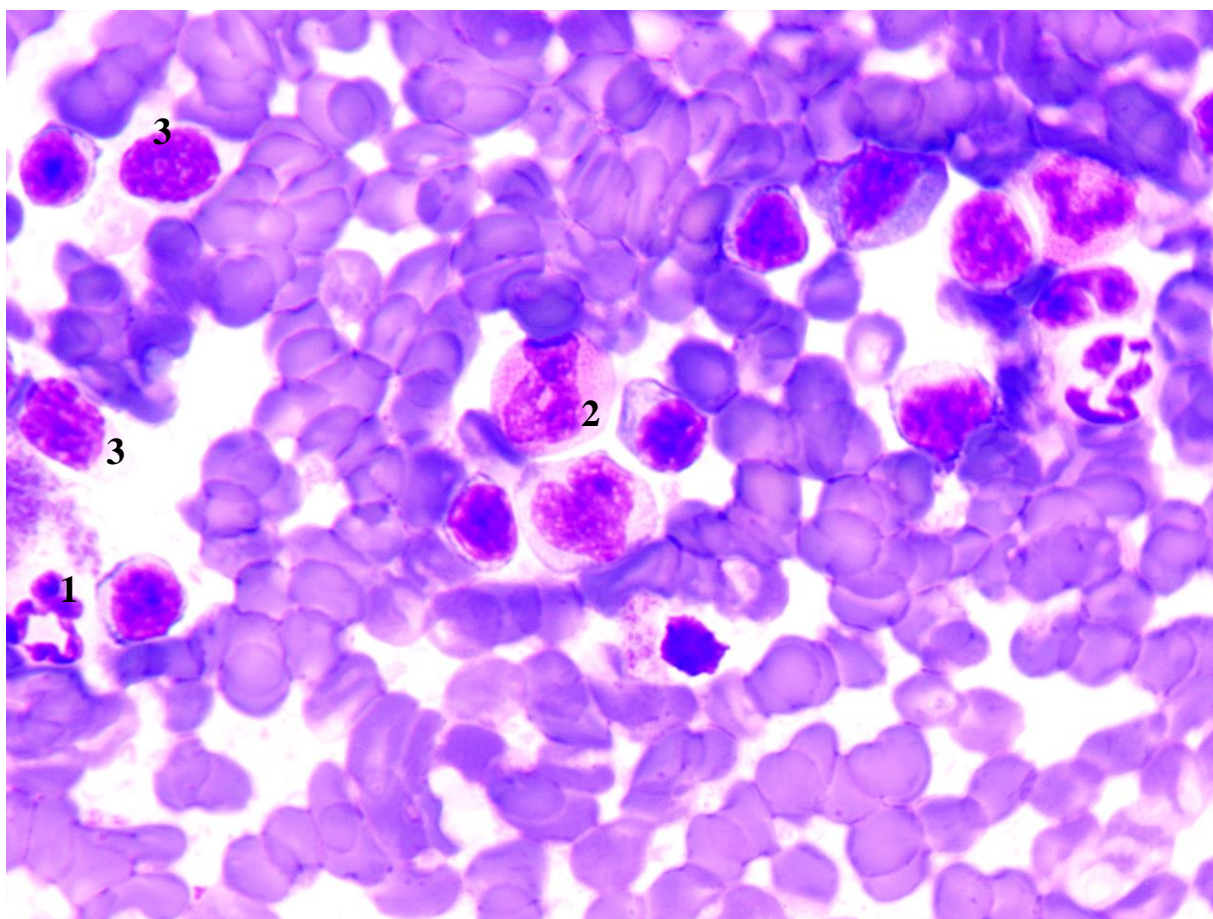


Рисунок 15 - Цитологическая картина мастоцитомы селезенки: клетки воспаления (нейтрофил - 1, эозинофил – 2), атипичные клетки (3).

Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

В цитограмме на фоне клеток воспаления обнаружены атипичные клетки мезенхимального происхождения с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Клетки располагаются разрозненно.

Клетки крупные и средние, округлой и полигональной формы. Ядра округлой формы, расположенные эксцентрично. Хроматин мелкозернистый, неравномерно распределенный, базофильный. Клетки содержат азурофильные цитоплазматические гранулы. Цитоплазма скудная. Выявляется множество эозинофилов.

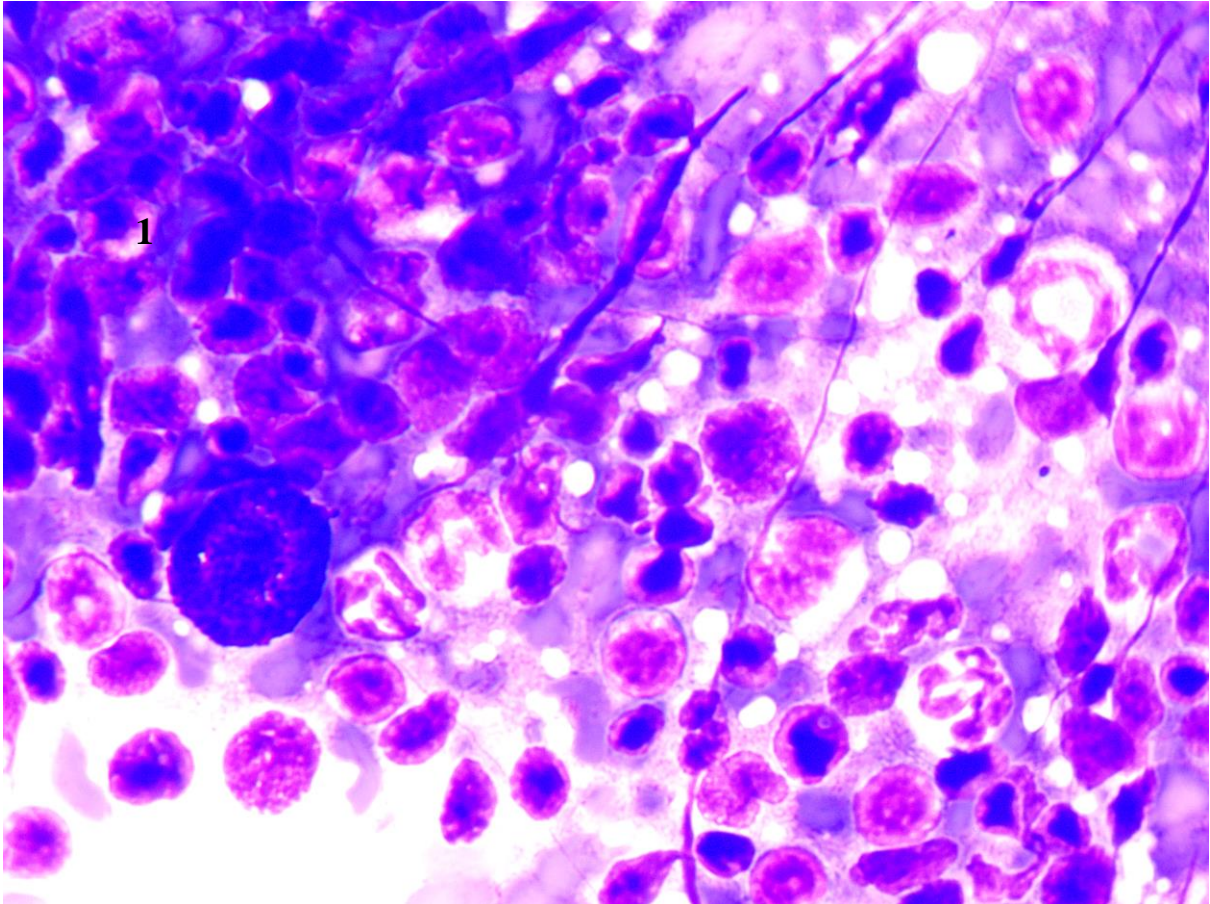


Рисунок 16 - Цитологическая картина фибросаркомы селезенки: скопление атипичных клеток (1). Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

В цитограмме обнаружены атипичные клетки мезенхимального происхождения с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Клетки располагаются скоплениями. Клетки крупные и средние, полигональной и вытянутой формы. Ядра средние и крупные, вытянутой формы. Ядерная оболочка неровная, утолщенная. Ядра содержат 2-3 увеличенных ядрышка. Хроматин неравномерно распределенный, темнобазофильный, мелкозернистый. Цитоплазма обильная, вакуолизированная, базофильная. Наблюдается двуядерность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованиям в области энзоотического лейкоза крупного рогатого скота посвящены ряд работ, касающихся изучению эпизоотологии и патогенеза заболевания, взаимодействия вируса с клеткой на молекулярном и генетическом уровнях, диагностике и дифференциальной диагностике данного заболевания, совершенствованию мер борьбы с ним и предотвращению его распространения. Однако до сих пор не разработано средств специфической профилактики этой инфекции, что связано не только со сложностями создания, но и с трудностями апробирования новых препаратов на животных. В мировой литературе работы, посвященные разработке адекватных моделей для изучения *BLV*-инфекции, представлены скудно. Что и явилось основной предпосылкой выполнения проведенных нами исследований.

Обобщая и анализируя данные литературных источников и полученные нами результаты исследований можно заключить, что моделирование лейкозной инфекции на белых крысах путем парентерального введения им лимфоцитов *BLV*-положительных коров является более эффективным способом заражения, чем иные, встречающиеся в литературе и ранее апробированные нами методы, включая парентеральное и алиментарное заражение лабораторных животных кровью [38, 42] и молоком инфицированных и больных лейкозом коров [2, 50]. Используемые при заражении животных кровь и молоко имеют в своем составе большое количество антигенов и биологически активных веществ, которые сами по себе уже оказывают непосредственное влияние на метаболизм и реактивность организма животного. В то время как целями экспериментальной инфекции служат не только доказательство инфекционности возбудителя, но и изучение биологических эффектов взаимодействия микро- и макроорганизма на разных уровнях: молекулярном, клеточном, тканевом, органном, системном, организменном, популяционном, а также межпопуляционном, что особенно актуально при

изучении паразитов, склонных к межвидовой миграции. В последнее десятилетие сообщения о возможной межвидовой передаче возбудителя ЭЛ КРС и его потенциальной опасности для человека встречаются все чаще [109, 145], что подтверждает актуальность выполненной нами научно-исследовательской работы.

Линейные крысы - достаточно популярная лабораторная модель при многих исследованиях, так как их метаболизм и жизненный цикл хорошо изучены и описаны в методической литературе, а, соответственно, являются предсказуемыми и управляемыми, во всяком случае, относительно диких или беспородных животных. Кроме того, их размеры позволяют получить достаточное для многопараметрического анализа количество биологического материала, чего нельзя сказать, например, о мышах. Крысы более резистентны к стрессам, чем морские свинки, всеядны, если сравнивать их с кроликами. Стоимость крыс значительно ниже, чем мелких жвачных, которых рекомендуют для воспроизведения энзоотического лейкоза. И еще одно очень важное их преимущество – плодовитость, что позволяет дать оценку воздействия на них того или иного фактора в поколениях животных, на нескольких генерациях за короткий срок.

Таким образом, все выше сказанное определило наш выбор при поиске объекта исследования и методики воспроизведения инфекции.

Гематологические исследования позволяют оценить состояние отдельных органов, их систем и гомеостаза организма в целом с разных точек зрения, что определяется набором анализируемых параметров.

По нашим данным, количество эритроцитов и содержание гемоглобина крови у животных опытных групп было достоверно снижено на 21,6%/15,6% и 29,5%/23,4% у взрослых крыс, а у их потомства на 39,2%/17,8% и 61,7%/48% при росте показателей ширины распределения эритроцитов по объему и среднего объема эритроцитов на 20,2% и 11,2%, а также содержания тромбоцитов и их среднего объема на 17,2%/25,5% и 20,1%/25,0% относительно контроля. При этом содержания лейкоцитов, а

также фракций лимфоцитов и средних клеток у инфицированных взрослых крыс увеличивалось на 21,3%/17,4%/22,2% и 35,6%/35,4%/26,8%, фракции гранулоцитов, напротив, снижалось на 37% и 75,3% через 3 и 6 месяцев от начала эксперимента. У их потомства количество лейкоцитов со временем возрастало на 29,9% и 30,6%, при увеличении фракции лимфоцитов на 13,5% и 26,2%, средних клеток крови на 25,0% и 26,3% и снижении фракции гранулоцитов на 22,4% и 58,2% относительно контроля.

У крыс опытной группы с течением времени увеличивалось содержание креатинина и мочевины в сыворотке крови на 14,5%/9,5% и 22,5%/11,9% на фоне снижения общего белка крови и фракции альбумина на 8,0%/27,8% и 35,4%/39,3%. Снижалась активность амилазы крови на 21,3% при уменьшении содержания глюкозы крови на 18,4% к концу исследования. При этом был отмечен рост активности ферментов АЛТ, АСТ и ЛДГ в 1,4/2,3; 1,7/3,2 и 1,3 раз на фоне увеличения содержания билирубина крови в 2,8/2,6 раз в динамике эксперимента. У их потомства также отмечали рост показателей креатинина и мочевины на 55,5% и 60,7%/16% при снижении уровня общего белка и фракции альбумина на 13,4%/24,1% и 41,2%/37,4% по сравнению с контролем. Содержание глюкозы и активность амилазы крови на конец эксперимента снижались в 2 и 1,5 раза соответственно. Также отмечался рост активности ферментов АЛТ, АСТ и ЛДГ в сыворотки крови животных опытной группы в 1,6/3,6/1,4 и 1,9/3,7/1,6 раз и содержание билирубина в 2 и 4 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Анализ динамики иммунологического статуса крыс выявил, что содержание IL-1 β и его антагониста IL-1Ra у взрослых животных экспериментальной группы было на 19%/ в 2 раза и на 22%/ в 1,8 раз выше, чем в контроле, а у их потомства достоверно возрастало только количество IL-1Ra в 2,7/4,7 раз с течением времени. Содержание фракции С3 системы комплемента не имело достоверных отличий у животных экспериментальных и контрольных групп, в отличие от фракции С4,

которая в начале эксперимента была на 18% выше, а окончанию на 15% ниже, чем в контроле у взрослых крыс и возростала на 14%/29% у их потомства. Количество фрагмента С3а увеличивалось на 14% и 15% у взрослых крыс экспериментальной группы и их потомства, соответственно. Содержание С5а фрагмента в сыворотке крови опытной группы животных было в 2,7/7 раз выше, чем в контроле в динамике эксперимента, а у их потомства увеличивалось на 17%.

Цитологические исследования мазков-отпечатков из селезенки крыс экспериментальных групп выявили присутствие у них не характерных для контрольных групп животных клеточных элементов, таких как миелобласты, атипичные промиелоциты, «беркиттоподобные» клетки и иные опухолевые формы лимфоцитов, большое количество реактивных или бласттрансформированных лимфоцитов. Также были обнаружены патологические формы других клеток крови, такие как эритроциты с тельцами Папенгеймера, Кебо и Жолли и с «изъеденными» краями, гипогранулярные нейтрофилы с гипосегментацией ядра. Цитологическая картина мазков-отпечатков свидетельствует о присутствии в органе таких патологий, как гиперплазия, мастоцитомы, аденокарциномы и фибросаркомы.

Изучение коррелятивной связи между клинико-морфологическими и биохимическими показателями крови инфицированных разработанным нами способом лабораторных крыс, а также их иммунным статусом и цитологическими изменениями в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных демонстрируют, что *BLV*-инфекция у них сопровождается характерными изменениями и имеет четкие тенденции.

Проведенные исследования и анализ полученных в результате выполнения их данных позволяет нам сделать следующие выводы и дать рекомендации по практическому использованию результатов.

ВЫВОДЫ

1. Клинико-морфологический анализ крови крыс с экспериментальной *BLV*-инфекцией выявил выраженный в разной степени лимфолейкоз у 75% животных, нейтропению, признаки эритроцитарной аплазии, гемолитической или апластической анемии, маркеры аллергии.

2. При сравнительном анализе данных биохимических исследований сыворотки крови крыс были обнаружены признаки развития интоксикации у животных опытных групп, характеризующиеся наличием маркеров нарушения деятельности гепатобилиарной системы и фильтрационно-реабсорбционной функции почек, а также индикаторов присутствия деструктивных процессов.

3. Анализ динамики иммунологических показателей *BLV*-инфицированных крыс свидетельствует об активации классического пути иммунной реакции, детерминированного в большей мере С4 компонентом комплемента, и о развитии у них иммуносупрессии частично компенсаторного характера с предпосылками развития выраженной аллергической реакции.

4. Маркеры патологических изменений, обнаруженные в крови потомства *BLV*-инфицированных крыс, более динамичны, чем у взрослых животных, а иммунологические изменения характеризуются ярко выраженными признаками иммунной супрессии и умеренным, но стойким присутствием индикаторов аллергического состояния.

5. Обнаруженные цитологическими исследованиями мазков-отпечатков из селезенки *BLV*-инфицированных крыс патологические клеточные формы, представлены бластными, реактивными и атипичными клетками, имеющими тенденцию к пролиферации.

6. Выявленные нами патологические иммуноморфологические изменения у *BLV*-инфицированных крыс коррелируют с таковыми, характерными для *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Внутривентрикулярный способ заражения лабораторных крыс взвесью лимфоцитов *BLV*-инфицированного крупного рогатого скота рекомендован для более быстрого и информативного воспроизведения экспериментальной *BLV*-инфекции при разработке новых средств и способов профилактики энзоотического лейкоза.

2. Полученные результаты могут быть использованы в выполнении фундаментальных и прикладных научных исследований, в учебном процессе при подготовке бакалавров, специалистов, магистров и преподавателей-исследователей ветеринарного и биологического профилей, повышения квалификации работников агропромышленного комплекса, составлении рекомендаций в области ветеринарной медицины и животноводства.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективы дальнейшей разработки темы связаны:

- с изучением формы, течения и исхода инфекционного процесса у *BLV*-инфицированных крыс с целью выявления у них вирусной персистенции или продуктивной инфекции, определения вероятности вирусной/провирусной экспансии либо элиминации возбудителя;
- с выяснением инфекционности адаптированного в организме лабораторных животных возбудителя заболевания путем пассажа его интактным крысам по средствам разработанного автором способа с целью установления факта межвидовой передачи возбудителей лейкоза;
- с использованием данной биологической модели для дальнейшего *in vivo* изучения гуморальных и клеточных факторов иммунитета при *BLV*-инфекции с целью получения протективных противоопухолевых веществ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЭЛ КРС – энзоотический лейкоз крупного рогатого скота

ИЛ (IL) - интерлейкин

ФНО (TNF) – фактор некроза опухоли

EBL - бычий (энзоотический) лейкоз

КРС – крупный рогатый скот

ПЦР - полимеразная цепная реакция

RBC – эритроциты

HGB – гемоглобина

MCV - средний объем эритроцитов

RDWc - ширина распределения эритроцитов по объему

PLT - тромбоциты

WBC – лейкоциты

LYM – лимфоциты

MID - средние клетки крови

GRA – гранулоциты

MPV - средний объем тромбоцитов

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

НК – нормальные киллеры

Th – Т-хелперы

IFN - интерферон

ComC – система комплемента

Ig - иммуноглобулины

BLV - *bovine leukemia virus*

BIV - *bovine immunodeficiency virus*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакин, С.С. Оценка хозяйственно-полезных качеств коров молочных пород, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота в хозяйствах ставропольского края / С.С. Абакин, Е.С. Суржикова, В.А. Оробец // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. – № 1. – С. 63-66.
2. Алиментарное заражение кроликов вирусом лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Н.Г. Козырева Л.А., Иванова [и др.] // В сборнике: Материалы Международного агробиотехнологического симпозиума, посвященного 80-летию члена-корреспондента РАН, заслуженного деятеля науки РФ Сочнева В.В. – ФГБОУ ВПО «Нижегородская ГСХА», 2016. – С. 19-25.
3. Белякова, А.С. Клинико-морфологические изменения крови крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции / А.С. Белякова // Наука и образование. - 2020. – № 3 – режим доступа: <http://opusmgau.ru/index.php/see>.
4. Белякова, А.С. Биохимические изменения крови крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции / А.С. Белякова // Наука и образование. – 2020. – № 3 – режим доступа: <http://opusmgau.ru/index.php/see>.
5. Белякова, А.С. Обоснование целесообразности применения ПЦР при исследовании на лейкоз КРС / А.С. Белякова // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы VIII-й Международной студенческой научной конференции. – 2015. – С. 183-185.
6. Белякова, А.С. Разработка способа мультиплексной ПЦР для диагностики *BIV* и *BLV* / А.С. Белякова // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2017. – С. 162-165.
7. Белякова, А.С. Состояние факторов $IL-1\beta$ и $IL-1Ra$ при экспериментальном лейкозе у крыс / А.С. Белякова // Материалы Международной научно-практической конференции «От инерции к

развитию: научно-инновационное обеспечение сельского хозяйства». – Пос. Персиановский: ФГБОУ ВО Донской ГАУ, 2020. – С. 61-63.

8. Белякова, А.С. Состояние факторов системы комплемента С3 и С4 при экспериментальном лейкозе у крыс / А.С. Белякова // Материалы Международной научно-практической конференции «От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение сельского хозяйства». – Пос. Персиановский: ФГБОУ ВО Донской ГАУ, 2020. – С. 63-65.

9. Белякова, А.С. Сравнение молекулярно-генетической структуры *BIV* и *BLV* / Белякова А.С. // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2017. – С. 165-168.

10. Белякова, А.С. Сравнение ущерба от снижения продуктивности при различных подходах к лечению диспепсии телят, полученных от *BLV*-инфицированных коров / А.С. Белякова, Е.С. Красникова, А.А. Смагина // Аграрная наука - сельскому хозяйству: сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции. – 2019. – С. 259-260.

11. Белякова, А.С. Цитологические изменения в селезенке лабораторных крыс при экспериментальной *BLV* инфекции / А.С. Белякова // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2018. – С. 33-37.

12. 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.

13. Вангели, С.В. Сравнительная ультраструктурная характеристика культур клеток, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота / дис... канд. вет. наук: 16.00.03 // Вангели Сергей Валерьевич. – М., 2015. – 114 с.

14. Влияние метаболических процессов на устойчивость крупного рогатого скота к лейкозу / А.Е. Кузнецова, В.Н. Ласкавый, Е.И. Тихомирова [и др.] // Вестник Чеченского государственного университета. – 2017. – № 2 (26). – С. 101-106.

15. Влияние ретровирусной инфекции коров на технологию и сроки хранения творога / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, А.В. Красников, Г.Х. Утанова // Вестник КрасГАУ. – 2017. – № 12 (135). – С. 50-58.

16. Галеев, Р.Ф. Теоретическое обоснование, экспериментальное подтверждение путей передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота, усовершенствование методов диагностики и мер борьбы с ним / автореф дис... докт. вет. наук: 16.00.03 // Галеев Рафаил Фаррахович - Казань, 2000 – 41 с.

17. Гематологические показатели крыс линии Wistar при экспериментальной *BLV*-инфекции / Е.С. Красникова, А.В. Красников, Р.В. Радионов, А.С. Белякова, В.И. Околелов // Инновации и продовольственная безопасность. – 2018. – № 4 (22). – С. 138-145.

18. Горячева, Г.А. Воспроизведение лейкоза крупного рогатого скота у кроликов в экспериментальных условиях / Г.А. Горячева, А.А. Грицын, // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. – С. 111-113.

19. Денисенко, Т.С. Изучение острой токсичности препарата "Димикар" / Т.С. Денисенко // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. – № 1 (25). – С. 67-72.

20. 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 на изобретение RU 2615465 С, 04.04.2017. Заявка № 2015132112 от 31.07.2015.

21. Динамика гуморальных факторов иммунитета крыс при экспериментальной *BLV*-инфекции / Е.С. Красникова, С.В. Козлов, А.В.

Красников, А.С. Белякова, Р.В. Радионов // Аграрный научный журнал. – 2020. – №11. – С. 56-59.

22. Донник, И.М. Молекулярно-генетические и иммуно-биохимические маркеры оценки здоровья сельскохозяйственных животных / И.М. Донник, И.А. Шкуратова // Вестник Российской академии наук. – 2017. – Т. 87, № 4. – С. 36–366.

23. Зависимость восприимчивости крупного рогатого скота к лейкозу от биохимических показателей крови / М.Л. Малинин, А.Е. Кузнецова, М.А. Шibaева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013 – Вып.8, №10. – С. 132-136.

24. Иванова, О. Ю. Изучение динамики гематологических показателей у коров на разных стадиях лейкозного процесса / О. Ю. Иванова, В. В. Пронин, О. В. Иванов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 3(31). - С. 85-88.

25. Иммуноморфологические изменения, сопровождающие развитие гемобластозов человека и животных / П.Н. Смирнов, В.В. Храмцов, С.Н. Магер [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. 2017. № 4 (18). С. 39-50.

26. Итэсь, Ю.В. Результаты комплексных иммунобиохимических исследований крупного рогатого скота разной породной принадлежности и компрометации к лейкозу: автореферат дис... канд. биол. наук: 16.00.03 / Итэсь Юрий Викторович. – Новосибирск, 2002. – 22 с.

27. Красников, А.В. Динамика биохимических показателей крыс линии Wistar при парентеральном инфицировании *BLV* / А.В. Красников, А. С. Белякова, Е.С. Красникова // Инновации и продовольственная безопасность. – 2020. – № 3(29). – С.

28. Красников, А.В. Динамика морфологических показателей крыс линии Wistar при парентеральном инфицировании *BLV* / А.В. Красников, А. С. Белякова, Е.С. Красникова // Инновации и продовольственная безопасность. – 2020. – № 2(28). – С. 76-81.

29. Красникова, Е.С. Биологическая безопасность продукции животных, инфицированных вирусами энзоотического лейкоза и иммунодефицита КРС / Е.С. Красникова, О.С. Ларионова // Вестник ветеринарии. – 2014. – № 2(69). – С. 85-87.

30. Красникова, Е.С. Биологическое обоснование совершенствования ветеринарных правил по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота / Е.С. Красникова, Р.В. Радионов, А.С. Белякова // Агрофорсайт. – 2017. – № 1 (7). – С. 1.

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

32. Красникова, Е.С. Иммунобиологические проявления ретровирусных инфекций крупного рогатого скота/ Е.С. Красникова, А.В. Кудинов, А.С. Белякова // Научная жизнь. – 2015. – № 1. – С. 168-175.

33. Красникова, Е.С. О необходимости ужесточения мер контроля над энзоотическим лейкозом крупного рогатого скота / Е.С. Красникова, Т.А. Плютина // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 50. – С. 131-133.

34. Ласкавый, В.Н. Новый антиген для новой диагностической реакции на лейкоз крупного рогатого скота / В.Н. Ласкавый, А.Е. Кузнецова, Е.И. Тихомирова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Т. 18, № 2-3. – С.740-745.

35. Люто, А.А., Морфология клеток крови коров с серопозитивной и гемосомнительной реакцией на лейкоз/ Люто А.А., Филиппев М.М., Н.В. Донкова // Вестник КрасГАУ. – 2012. – № 10 (73). – С. 144-148.

36. Макаров, В.В. Трансмиссия и патогенез лейкоза крупного рогатого скота / В.В. Макаров // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2020. – № 2. – С. 44-47.

37. Марушева, Ю.А., Совершенствование диагностики ретровирусных инфекций кошек / Ю.А. Марушева, А.С. Белякова, В.А. Савельева //

Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. Челябинск: Южно-Уральский ГАУ, 2016. – С. 157-159.

38. Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте / М.И. Гулюкин, Н.Г. Козырева, Л.А. Иванова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2015. – № 360(5). – С. 32-37.

39. Мифы о лейкозе крупного рогатого скота / П.Н. Смирнов, И.В. Тростянский, В.В. Храмцов [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2020. – № 1 (27). – С. 73-78.

40. Морфологическая характеристика периферической крови коров, инфицированных *BLV*, и частота регистрации лейкомоидных реакций у коров неблагополучных по лейкозу стад / П.Н. Смирнов, С.М. Чыдым, И.В. Тростянский, О.С. Котлярова // Инновации и продовольственная безопасность. – 2020. – № 1 (27). – С. 66-72.

41. Мотавина, Л.И. Иммунобиологический статус коров-матерей, больных лейкозом и телят, инфицированных ВЛКРС, внутриутробно и спонтанно / Л.И. Мотавина, А.И. Иванов // Научное обеспечение устойчивого развития АПК: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Уфа, 2011. – С. 147-149.

42. Мустафаев, А.Р. К вопросу о барьерах специфичности вируса бычьего лейкоза в эксперименте с белыми крысами линии «Wistar» / А.Р. Мустафаев, К.С. Бекшоков // Вестник Дагестанского государственного университета. – 2014. – Вып. 1. – С. 135-138.

43. О лейкозе крупного рогатого скота / П.Н. Смирнов, И.В. Тростянский, В.В. Храмцов [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2020. – № 1 (27). – С. 73-78.

44. Оценка качества молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров и определение способов его переработки / Е.С. Красникова, Г.Х. Утанова, Н.А. Федосов [и др.] // Научное обозрение. – 2015. – № 17. – С. 10-15.

45. Парахонский, А.П. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний // / А.П. Парахонский // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 4. – С. 63-64.

46. 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.

47. Пономарёва, И.С. Гемато-биохимический статус коров с разной степенью компрометации к лейкозу в Оренбуржье / И.С. Пономарёва, С.П. Загуменников, М.В. Сычёва [и др.] // Ветеринарная наука. – 2011. – Т. 13. – С. 84-86.

48. Противоопухолевые моноклональные антитела / Ж.И. Авдеева, А.А Солдатов., М.В. Киселевский, Н.В. Медуницын // Иммунология. – 2017. – 38 (5). – С. 256-280.

49. Прудникова, В.Н. Иммунологические и гематологические проявления лейкоза у коров в зависимости от породной принадлежности: Автореферат дисс... канд. вет. наук: 16.00.03 / Прудникова Виолетта Николаевна – Барнаул, – 2008. – С 23.

50. Радионов, Р.В. Новые подходы к моделированию лейкозного процесса и коррекции клинического статуса телят, полученных от *BLV*-инфицированных коров: автореферат дис.: 06.02.02 / Радионов Роман Владимирович. – Саратов, 2019 - 21 с.

51. Радионов, Р.В. Применение новой лекарственной композиции для лечения диспепсии телят, полученных от *BLV*-инфицированных коров / Р.В. Радионов, Е.С. Красникова, А.С. Белякова // Вестник КрасГАУ. – 2019. – № 2 (143). – С. 77-84.

52. Радионов, Р.В. Экономическая эффективность применения разработанной лекарственной композиции для лечения диспепсии у телят, полученных от *BLV*-инфицированных коров / Р.В. Радионов, А.С. Белякова

// Вклад ученых в повышение эффективности агропромышленного комплекса России: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2018. – С. 128-132.

53. Разработка технологии выделения нового антигена и условий постановки диагностической реакции на лейкоз крупного рогатого скота / А.Е. Кузнецова, В.Н. Ласкавый, Е.И. Тихомирова [и др.] // В сборнике: Современные социально-экономические процессы: проблемы, закономерности, перспективы сборник статей III Международной научно-практической конференции: в 2 частях. – 2017. – С. 178-180.

54. Рудакова, О.Н. Анализ современных методов диагностики и ветеринарно-санитарная экспертиза мяса при лейкозе крупного рогатого скота: автореф. дис... канд. биол. наук / О.Н. Рудакова. – М.: МГАВМиБ имени Скрябина, 2010. – 19 с.

55. Семененко, М.П. Оценка биохимических, гематологических и иммунологических показателей у инфицированных вирусом лейкоза КРС, больных лейкозом и интактных коров / М.П. Семененко, Н.Ю. Басова, Е.В. Кузьминова // Ветеринария Кубани. – 2011. – №2. – С. 22-23.

56. Симонян, Г.А. Ветеринарная гематология / Г.А. Симонян, Ф.Ф. Хисамутдинов. – М.: Колос, 1995. – 256 с.

57. Симонян, Г.А., Клинико-гематологическая и цитоморфологическая диагностика различных форм лейкоза крупного рогатого скота: автореферат дис... док. вет. наук: 16.00.02 / Симонян Грант Айказович – Москва, 1975 – 46 с.

58. Смирнов, П.Н. Болезнь века – лейкоз крупного рогатого скота / П.Н. Смирнов. – Новосибирск, 2007. – 301 с.

59. Смирнов, П.Н. Хронобиологические исследования патологического процесса при лейкозе жвачных / П.Н. Смирнов // Инновации и продовольственная безопасность. – 2016. – №4. – С. 7-14.

60. Смирнов, Ю. П. Теории возникновения рака и иммунологические аспекты канцеро- и лейкозогенеза / Ю. П. Смирнов // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2017. – № 3 (58). С. – 49-54.

61. Собирова, Д.Р. Результаты исследования мутагенной активности генномодифицированного продукта в экспериментах на лабораторных животных / Собирова Д.Р., Нуралиев Н.А., Е.Н. Гинатуллина // Безопасность здоровья человека. – 2017. – № 1. – С. 52-61.

62. Способ моделирования *BLV*-инфекции у экспериментальных животных / А.В. Красников, Е.С. Красникова, А.С. Белякова // Заявка на патент на изобретение RU № 2019110652 от 10.04.2019.

63. Сравнительные показатели Т- и В-лимфоцитов, иммуноглобулинов основных классов и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у инфицированных *BLV* и условно-патогенной микрофлорой коров / А.И. Павлова, П.Н. Смирнов, Л.П. Корякина [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2017. – № 1(15). – С. 17-21.

64. Тарасенко, П.А. Цитологические изменения при экспериментальной ретровирусной инфекции у животных / П.А. Тарасенко, А.С. Белякова // Наука и Образование: материалы 72-ой Международной научно-практической конференции студентов и аспирантов «Агровуз-2020: образование, наука, инновации». – Мичуринск, 2020. – № 1. С. 69.

65. Трофимов, О.В. Поиск маркеров лейкоза крупного рогатого скота на основе цитогенетических исследований / О.В. Трофимов, И.В. Пак, И.М. Донник // Ветеринария Кубани. – 2016. – № 1. – С. 11-13.

66. Трофимов, О.В. Цитологические, генетические и протеомные изменения в крови крупного рогатого скота, инфицированного вирусом лейкоза: автореф. дис. канд. биол. наук: 06.02.02 / Трофимов Олег Владимирович – Новосибирск: Тюменский гос. Ун-т., 2013. – 18 с.

67. Характеристика базы данных по нуклеотидным последовательностям изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота / Н.Г. Козырева, Л.А. Иванова, Т.В. Степанова, М.И. Гулюкин // Российский

журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2019. – № 1 (29). – С. 50-55.

68. Харченко, Е.П. Иммунная привилегия: патологический аспект / Е.П. Харченко // Иммунология. – 2009. – № 4. – С. 249-255.

69. Харченко, Е.П. Канцерогенез: иммунная система и иммунотерапия / Е.П. Харченко // Иммунология. – 2011. – № 1. – С. 50-56.

70. Черешнев, В.А. Иммунологические механизмы локального воспаления / В.А. Черешнев, М.В. Черешнева // Медицинская иммунология – 2011, – Т. 13 – № 6 – С. 557-568.

71. Чичина, С. В. Роль аллельной вариабельности генов цитокинов в формировании резистентности крупного рогатого скота к лейкозу: автореферат дис. кан. биол. наук: 16.00.03 / Чичина Светлана Викторовна – Новосибирск, 2005. – 28 с.

72. Шишков, В.П. Патоморфология и некоторые аспекты патогенезов гемобластозов крупного рогатого скота / В.П. Шишков, Г.В. Сноз // Тр. ВИЭВ. – М: 1999. – Т.72. – С. 149-156.

73. Abbas, A.K. Cellular and Molecular Immunology / A.K. Abba, A.H. Lichtman, S. Pillai // Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. – P. 284.

74. Activation of the complement cascade enhances motility of leukemic cells by downregulating expression of HO-1 / A.-I. Abdelbaset, S. Borkowska-Rzeszotek, E. Kubis [et al.] // Leukemia. – 2017. – N 31(2). – P. 446-458.

75. Aida, Y. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. Review / Y. Aida, H. Murakami, M. Takahashi // Front Microbiol. – 2013. N 4. – P. 328.

76. Altanero, V. Induction of immune deficiency syndrome in rabbits by bovine leukaemia virus / V. Altanero, J Ban, C. Altaner // AIDS. – 1989. N 3(11). – P. 755-758.

77. Altanero, V. Induction of leukemia in chicken by bovine leukemia virus due to insertional mutagenesis / V. Altanero // Arch Geschwulstforsch. – 1990. – N 60(2). – P. 89-96.

78. Analysis of hemo-biochemical status of cows infected with retroviruse / E.S. Krasnikova, A.V. Krasnikov, V.V. Annikov [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2018. – Vol 9(3). – P. 1122-1128.

79. Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression / L. Corrales, D. Ajona, S. Rafail [et al.] // J Immunol. – 2012. – N 189(9). – P. 4674-4683.

80. Angelopoulou, M.K. Nodal marginal zone lymphoma / M.K. Angelopoulou // Leuk Lymphoma. – 2014. N 55. – P. 1240-1250.

81. Bernet, J. Review Viral mimicry of the complement system/ J. Mullick, A.K. Singh, A. Sahu // J Biosci. – 2003. – N 28(3). – P. 249-264.

82. *BLV*: lessons on vaccine development / A. Abdala, I. Alvarez, H. Brossel [et al.] // Retrovirology. – 2019. – N 16(1). – P. 26.

83. Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption / N.N. Olaya-Galán, A.P. Corredor-Figueroa, T.C. Guzmán-Garzón, K.S. Ríos-Hernandez // Epidemiol Infect. – 2017. – N 145. – P. 3125-3130.

84. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. / P.C. Bartlett, B. Norby, T.M. Byrem [et al.] // J Dairy Sci. – 2013. – N 96. – P. 1591-1597.

85. Bovine Leukemia Virus DNA in Human Breast Tissue / G.C. Buehring, H.M. Shen, H.M. Jensen [et all.] // Emerg Infect Dis. – 2014. – N 20(5). – P. 772-782.

86. Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma / L.C. Lee, W.K. Scarratt, G.C. Buehring, G.K. Saunders // Can. Vet. J. – 2012. – N 53. – P. 283-286.

87. Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF- β secretion from regulatory T cells / O. Kosuke, N. Ayako, K. Satoru [et al.] // Immun Inflamm Dis. – 2016. – N 4(1). –P. 52-63.

88. Buehrin, G.C. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. / G.C. Buehrin, S.M. Philpott, K.Y. Choi // AIDS Res. – Hum. Retroviruses. – 2003. – N 19. – P. 1105-1113.

89. Buehring, G.C. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows / G.C. Buehring, P.M. Kramme, R.D. Schultz // Lab Investig. – 1994. – N 71. – P. 359-365.

90. C5a promotes the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells through PCAF-mediated STAT3 acetylation / K. Cai, Y. Wan, Z. Wang [et al.] // Oncol Rep. – 2014. – N 32(5). – P. 2260-2266.

91. C5aR is frequently expressed in metastatic renal cell carcinoma and plays a crucial role in cell invasion via the ERK and PI3 kinase pathways / Y. Maeda, Y. Kawano, Y. Wada [et al.] // Oncol Rep. – 2015. – N 33(4). – P. 1844-1850.

92. Can Bovine Leukemia Virus Be Related to Human Breast Cancer? A Review of the Evidence / L.M. Cuesta, P.A. Lendez, M.V. Nieto Farias [et al.] // J Mammary Gland Biol Neoplasia. – 2018. – V. 23(3). – P. 101-107.

93. Canine indolent nodular lymphoma / V.E. Valli, W. Vernau, L.P. de Lorimier [et al.] // Vet. Pathol. – 2006. – N 43. – P. 241-256.

94. Canine lymphomas: Association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival / V.E. Valli, P.H. Kass, M.M. San [et al.] // Vet. Pathol. – 2013. – N 50. – P. 738-748.

95. Canine lymphoproliferative disease characterized by lymphocytosis: Immunophenotypic markers of prognosis / M.J. Williams, A.C. Avery, S.E. Lana [et al.] // J. Vet. Int. Med. – 2008. – N 22. – P. 596-601.

96. Complement 5a Enhances Hepatic Metastases of Colon Cancer via Monocyte Chemoattractant Protein-1-mediated Inflammatory Cell Infiltration / C. Piao, L. Cai, S. Qiu [et al.] // J Biol Chem. – 2015. – N 290(17). – P. 10667-10676.

97. Complement and antibodies: a dangerous liaison in HIV infection. Review / H. Stoiber, A. Soederholm, D. Wilflingseder [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – N 26. – P. 179-185.

98. Complement c5a receptor facilitates cancer metastasis by altering T-cell responses in the metastatic niche / S.K. Vadrevu, N.K. Chintala, S.K Sharma [et al.] // *Cancer Res*. – 2014. – N 74(13). – P. 3454-3465.

99. CREB transcription factor modulates Bcl2 transcription in response to C5a in HL-60-derived neutrophils / M.C. Perianayagam, N.E. Madias, B.J. Pereira, B.L. Jaber // *Eur J Clin Invest*. – 2006. – N 36(5). – P. 353-361.

100. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle / Y. Yuan, Y. Kitamura-Muramatsu, S. Saito [et al.] // *Virus Res*. – 2015. – N 210. – P. 248-54.

101. Diagnosis and treatment of diffuse large B-cell lymphoma / U. Mey, F. Hitz, A. Lohri [et al.] // *Swiss. Med. Wkly*. – 2012. – N 142. – P. 13511.

102. Differential regulation of the C3a and C5a receptors (CD88) by IFN-gamma and PMA in U937 cells and related myeloblastic cell lines / M. Burg, U. Martin, D. Bock [et al.] // *J Immunol*. – 1996. – N 157(12). – P. 5574-5581.

103. Diffuse large B-cell lymphoma / M. Martelli, A.J. Ferreri, C. Agostinelli [et al.] // *Crit Rev. Oncol. Hematol*. – 2013. – N 87. – P. 146-171.

104. Djilali, S. The BLV-induced leukemia-lymphosarcoma complex in sheep. Review / S. Djilali, A.L. Parodi // *Vet Immunol Immunopathol*. – 1989. – N 22(3). – P. 233-244.

105. Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H and decay accelerating factor (DAF, CD55) / H. Stoiber, C. Pinter, A.G. Siccardi [et al.] // *J. Exp. Med*. – 1996. – N 183. – P. 307-310.

106. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of

enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR / C.J. Panei, Sh.-n. Takeshima, T. Omori [et al.] // *BMC Vet Res.* – 2013. – N. 9. – P. 95.

107. Evaluation of T lymphocytes in captive African lions (*Panthera Leo*) infected with feline immunodeficiency virus / M.E. Bull, S. Kennedy-Stoskopf, J.F. Levine [et al.] // *Am J Vet Res.* – 2003. – Vol. 64(10). – P. 1293-1300.

108. Evidence that a lipolytic enzyme--hematopoietic-specific phospholipase C- β 2-promotes mobilization of hematopoietic stem cells by decreasing their lipid raft-mediated bone marrow retention and increasing the promobilizing effects of granulocytes / M. Adamiak, A. Poniewierska-Baran, S. Borkowska [et al.] // *Leukemia.* – 2016. – N 30(4). – P.919-928.

109. 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.

110. Expression analysis of foxp3 in t cells from bovine leukemia virus infected cattle/ S. Suzuki, S. Konnai, T. Okagawa [et al.] // *Microbiol. ImmuNo.l.* – 2013. – N 57. – P. 600-604.

111. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response / Y. Fang, C. Xu, Y.X. Fu [et al.] // *J Immunol.* – 1998. – N 160(11). – P. 5273-5279.

112. Feline upper respiratory tract lymphoma: site, cyto-histology, phenotype, FeLV expression, and prognosis / S.F. Santagostino, C.M. Mortellaro, P. Boracchi [et al.] // *Vet Pathol.* – 2015. – N 52(2). – P. 250-259.

113. Follicular Lymphoma. In: Jaffe E.S. / N.L. Harris, J.W. Vardiman, E. Campo, D.A. Arber // *Hematopathology.* Elsevier Saunders. – St. Louis, 2011. – 267-290 p.

114. Frie, M.C. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle / M.C. Frie, P.M. Coussens // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2015. – N 163(3-4). – P. 103-114.

115. Fulton, BE. Dissemination of bovine leukemia virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node/ B.E. Fulton, M. Portella, K. Radke // *J Virol.* – 2006. – N 80. – P. 7873-7884.

116. Genetic and pharmacologic inhibition of complement impairs endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization / S. Nunez-Cruz, P.A. Gimotty, M.W. Guerra [et all.] // *Neoplasia.* – 2012. – N 14(11). – P. 994-1004.

117. Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus / C. Olson, R. Kettmann, A. Burny, R. Kaja // *J Natl Cancer Inst.* – 1981. – N 67(3). – P. 671-675.

118. Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction / M. Saifuddin, T. Hedayati, J.P. Atkinson [et al.] // *J Gen Virol.* – 1997. – N 78. – P. 1907-1911.

119. Immunopathologic study and characterization of the phenotype of transformed cells in sheep with bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma / K. Murakami, Y. Aida, R. Kageyama [et all.] // *Am J Vet Res.* – 1994. – N 55(1). – P. 72-80.

120. In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein / P. Kerkhofs, H. Heremans, A. Burny [et al.] // *J. Virol.* – 1998. – N 72. – P. 2554-2559.

121. In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex / K. Boris-Lawrie, V. Altanerova, C. Altaner [et al.] // *J Virol.* – 1997. – N 71(2). – P. 1514-1520.

122. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus / D. Wu, K. Murakami, A. Morooka [et al.] // *Virus Res.* – 2003. – N 97. – P. 81-87.

123. Inabe, K. Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine

leukemia virus / K. Inabe, K. Ikuta, Y. Aida // *Virology*. – 1998. – N 245(1). – P. 53-64.

124. Increased bovine tim-3 and its ligand expressions during bovine leukemia virus infection / T. Okagawa, S. Konnai, R. Ikebuchi [et al.] // *Vet. Res.* – 2012. – N 43. – P. 45.

125. Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection/ N. Sandev, M. Koleva, R. Binev [et al.] // *Veterinarski Archiv*. – 2004. – N 76. – P. 411-416.

126. Influence of the C5a-C5a receptor system on breast cancer progression and patient prognosis / T. Imamura, M. Yamamoto-Ibusuki, A. Sueta [et al.] // *Breast Cancer*. – 2015. – N 23(6). – P. 876-885.

127. Intracellular sensing of complement C3 activates cell autonomous immunity / J.C. Tam, S.R Bidgood, W.A. McEwan, L.C. James // *Science*. – 2014. – N 345(6201). – P. 1256070.

128. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows / O. Nekouei, J. Van Leeuwen, H. Stryhn [et al.] // *Prev Vet Med*. – 2016. – N 133. – P. 1-9.

129. Mammerickx, M. Experimental cross-transmissions of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species / M. Mammerickx, D. Portetelle, A. Burny // *Zentralbl Veterinarmed B*. – 1981. – N 28(1). – P. 69-81.

130. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus [et al.] // *Retrovirology*. – 2007. – N 4(1). – P. 18.

131. MicroRNAs Encoded by Bovine Leukemia Virus (BLV) Are Associated with Reduced Expression of B Cell Transcriptional Regulators in Dairy Cattle Naturally Infected with BLV / M.C. Frie, C.J. Droscha, A.E. Greenlick, P.M. Coussens // *Front Vet Sci*. – 2017. – N 4. – P. 245.

132. Nagy, D.W. Overview of bovine Leukosis / D.W. Nagy // In: *Merck veterinary manual*. – Kenilworth, New Jersey: Merck Inc, 2014. – P. 54-58.

133. New evidence of bovine leukemia virus circulating in Myanmar cattle through epidemiological and molecular characterization / M. Kyaw, P. Meripet, B. Liushiqi [et al.] // *PLoS One*. – 2020. – N 15(2). – P e0229126.
134. New hematological key for bovine leukemia virus-infected Japanese Black cattle / H. Mekata, M. Yamamoto, Y. Kirino [et al.] // *J Vet Med Sci*. – 2018. – N 80(2). – P. 316-319.
135. Nogai, H. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma / H. Nogai, J. Clin // *Oncol*. – 2011. – N 29. – P. 1803-1811.
136. Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma / Y. Nagaoka, H. Kabeya, M. Onuma [et al.] // *Cancer Res*. – 1999. – N 59(4). – P. 975-981.
137. Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma / J.F. Ferrer, R.R. Marshak, D.A. Abt [et al.] // *Ann Rech Vet*. – 1978. – N 9. – P.851-857.
138. Polat M. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus / M. Polat, Sh.-n. Takeshima, Y. Aida // *Virol J*. – 2017. – N 14. – P. 209.
139. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for *HTLV* / S.M. Rodriguez, A. Florins, N. Gillet [et al.] // *Viruses*. – 2011. – N 3. – P. 1210-1248.
140. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection / D.D. Ho, A.U. Neumann, A.S. Perelson [et al.] // *Nature*. – 1995. – N 373(6510). – P. 123-126.
141. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. / V.W. Valeri, A. Hryniewicz, V. Andresen [et al.] // *Blood*. – 2010. – N 116. – P. 3809-3817.
142. Saini, S.S. Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies / S.S. Saini, B. Allore, R.M. Jacobs, A. Kaushik // *Eur J Immunol*. – 1999. – N 29. – P. 2420-2426.

143. Schraufstatter, I.U. Complement activation in the context of stem cells and tissue repair Review / I.U. Schraufstatter, S.K. Khaldoyanidi, R.G. DiScipio // *World J Stem Cells*. – 2015. – N 7(8). – P. 1090-1108.
144. Seelig, D.M. The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma / D.M. Seelig, A.C. Avery, E.J. Ehrhart // *Vet Sci*. – 2016. – N 3. – P. 11.
145. Sinha, G. Bovine Leukemia Virus Possibly Linked to Breast Cancer / G. Sinha // *J Natl Cancer Inst*. – 2016 – N 108(2). – P. djw020.
146. Surface morphology of leukemic cells from chronic myeloid leukemia under atomic force microscopy / A. Gaman, E. Osiac, I. Rotaru, C. Taisescu // *Current Health Sciences Journal*. – 2013. – Vol.39. – P. 45-47.
147. Synergy between the classical and alternative pathways of complement is essential for conferring effective protection against the pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus infection / A. Rattan, S.D. Pawar, R. Nawadkar [et al.] // *PLoS Pathog*. – 2017. – N 13(3). – P. e1006248.
148. Teske, E. Cytology of the lymphoid tissues / In: Dunn J., editor // *Manual of Diagnostic Cytology of the Dog and Cat*. – Wiley Blackwell; 2014. – P. 330-356.
149. Christou, L. The global burden of bacterial and zoonotic infections / L. Christou // *Clin Microbiol Infect*. – 2011. – N 17. – P. 326-30.
150. 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(3). – P. 382-388.
151. The membrane complement regulatory protein CD59 promotes tumor growth and predicts poor prognosis in breast cancer / Q. Ouyang, L. Zhang, Y. Jiang [et al.] // *Int J Oncol*. – 2016. – N 48(5). – P. 2015-2024.
152. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR / S. Konnai, T. Usui, K. Ohashi, M. Onuma // *Vet. Microbiol*. – 2003. – N 94. – P. 283-294.

153. 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 [et al.] // Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE 5, Optical Technologies in Biophysics and Medicine. – Saratov, 2018. – P. 107160G.

154. Tomohiro, Okagawa. Cooperation of PD-1 and LAG-3 in the exhaustion of CD4+ and CD8+ T cells during bovine leukemia virus infection / T. Okagawa, S. Konnai, A. Nishimori [et al.] // Vet Res. – 2018. – N 49. – P. 50.

155. Transplantation studies in C3-deficient animals reveal a novel role of the third complement component (C3) in engraftment of bone marrow cells / M.Z. Ratajczak, R. Reza, M. Wysoczynski [et al.] // Leukemia. – 2004. – N 18(9). – P. 1482-1490.

156. Vaccination against δ -Retroviruses: The Bovine Leukemia Virus Paradigm/ G. Gutiérrez, S.M. Rodríguez, A. de Brogniez [et al.] // Viruses. – 2014. – N 6. – P. 2416-2427.

157. Vail, D.M. Hematopoietic Tumors / D.M. Vail, D.H. Thamm, J.M. Liptak // Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. – 2019 – N 33 – P. 688-772.

158. Villalobos-Cortés, A. Enzootic bovine leucosis and the risk to human health / A. Villalobos – Cortés // African Journal of Biotechnology. – 2017. – N. 16(15). – P. 763-770.

159. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma / J.M. Miller, L.D. Miller, C. Olson, K.G. Gillette // J Natl Cancer Inst. – 1969. – Vol.43. – P.1297-1305.

160. You, M.J. T-lymphoblastic leukemia/lymphoma / M.J. You, L.J. Medeiros, E.D. Hsi // Am. J. Clin Pathol. – 2015. – N 144. – P. 411-422.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

		Стр.
Рисунок 1	Схема выполнения научных исследований.	35
Рисунок 2	Динамика форменных элементов крыс: эритроциты (RBC), $10^{12}/л$; лейкоциты (WBC), $10^9/л$; тромбоциты (PLT), $10^{11}/л$.	38
Рисунок 3	Динамика относительной концентрации лимфоцитов (LYM) и гранулоцитов (GRA) у крыс, %.	39
Рисунок 4	Динамика активности ферментов сыворотки крови крыс, Ед/л.	43
Рисунок 5	Динамика мочевины (ммоль/л), глюкозы (ммоль/л) и билирубина (мкколь/л) в сыворотке крови крыс.	44
Рисунок 6	Динамика белковых фракций (г/л) и креатинина (мкмоль/л) в сыворотке крови крыс	44
Рисунок 7	Динамика цитокинов в сыворотке крови крыс: IL-1 β (пкг/мл), IL-1Ra (мкг/мл), C3(нг/мл), C4 (нг/мл), C3a (нг/мл) и C5a (нг/мл).	51
Рисунок 8	Патологические формы клеток крови: миелобласт (1), атипичный промиелоцит (2), реактивные лимфоциты (3)	62
Рисунок 9	Патологические формы эритроцитов: Тельца Кебо (1), Жоли (2) и Папенгеймера (3), «изъеденные» края (4).	63
Рисунок 10	Опухолевые «беркиттоподобные» клетки (1).	64
Рисунок 11	Опухолевые формы лимфоцитов (1)	65
Рисунок 12	Патологические формы нейтрофилов: агранулярный (1), с нарушенной сегментацией (2).	66
Рисунок 13	Цитологическая картина гиперплазии селезенки: нейтрофил (1), лимфоцит (2), центробласт (3),	67

центроцит (4), плазматическая клетка (5), мастоцит (6) и гистиоцит (7). (диаметр и высота – μm , площадь – μm^2 , объем – μm^3)

Рисунок 14	Цитологическая картина аденокарциномы селезенки: клетки воспалени (нейтрофил – 1 и эозинофил – 2), атипичные клетки (3).	68
Рисунок 15	Цитологическая картина мастоцитомы селезенки: клетки воспаления (нейтрофил - 1, эозинофил – 2), атипичные клетки (3).	69
Рисунок 16	Цитологическая картина фибросаркомы селезенки: скопление атипичных клеток (1).	70
Таблица 1	Данные общего анализа крови взрослых крыс	36
Таблица 2	Данные общего анализа крови потомства инфицированных крыс	37
Таблица 3	Данные биохимического анализа крови крыс	41
Таблица 4	Данные биохимического анализа крови потомства крыс	42
Таблица 5	Данные иммунологических исследований взрослых крыс	47
Таблица 6	Данные иммунологических исследований потомства крыс	49

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2615465

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ДНК ПРОВИРУСОВ ЛЕЙКОЗА И ИММУНОДЕФИЦИТА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ
МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова" (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2015132112

Приоритет изобретения 31 июля 2015 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 04 апреля 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 31 июля 2035 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Иванев



Коротковой Г.В.
для работы

«24.07.2020»

(подпись)

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

22.06.2020	036275	2020121251
Дата поступления	Входящий №	Регистрационный №

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ (дата регистрации оригинала заявки)	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
22 ИЮН 2020		
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
<input type="checkbox"/> (86) ФИПС <input type="checkbox"/> (87) <input type="checkbox"/> (88) <input type="checkbox"/> (89) <input type="checkbox"/> (90) <input type="checkbox"/> (91) <input type="checkbox"/> (92) <input type="checkbox"/> (93) <input type="checkbox"/> (94) <input type="checkbox"/> (95) <input type="checkbox"/> (96) <input type="checkbox"/> (97) <input type="checkbox"/> (98) <input type="checkbox"/> (99) <input type="checkbox"/> (100)	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (почтовый адрес, факс и электронная почта)	
	393760, Тамбовская область, г. Мичуринск, ул. Интернациональная, 101 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Мичуринский государственный аграрный университет» Телефон: 8(47545)5-46-62 Факс: 8(47545)5-26-35 Адрес электронной почты: info@mipa.ru	
АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ (используется при подаче заявки на секретное изобретение)		
В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация		
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ BVV-ИНФЕКЦИИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Мичуринский государственный аграрный университет», 393760, Тамбовская область, г. Мичуринск, ул. Интернациональная, 101	ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1026801063508 КПП 682701001 ИНН 6827002894 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (если он установлен)	ОТД № 17 29 ИЮН 2020 240-60-15 9
<input type="checkbox"/> изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнитель работ (укажите наименование)		
<input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту заключен работ (укажите наименование)		
Контракт от №		
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ (лицо, которое при подаче заявки несет ответственность за подачу заявки лицом по юридическим вопросам от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности или являющийся изобретателем в силу закона)	<input type="checkbox"/> патентный поверенный <input type="checkbox"/> представитель по доверенности <input type="checkbox"/> представитель по закону	
Фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии) Адрес Срок представительства (если в заявлении предусмотрена ответственность представителя за нарушение сроков подачи заявки)	Телефон: Факс: Адрес электронной почты: Регистрационный номер патентного поверенного	

Общее количество документов в листах	34	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Соколова Е.А.
Количество платежных документов	2	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		

ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ
ВХОД № 72-47/2019
ДАТА 23 ИЮЛ 2020

Федеральная служба по интеллектуальной
собственности
Федеральное государственное бюджетное
учреждение



«Федеральный институт
промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-499) 240-60-15. Факс (8-495) 531-63-18

Коротковой Г.В.
для работы

«09.07.2020»
(подпись)

Форма N 91 ИЗ-2017
910,371,401

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Мичуринский государственный
аграрный университет"
ул. Интернациональная, 101
г. Мичуринск
Тамбовская обл.
393760

На № - от -
Наш № 2020121251/14(036275)
При перепишке просим ссылаться на номер заявки
Исходящая корреспонденция от 09.07.2020

УВЕДОМЛЕНИЕ

о положительном результате формальной экспертизы
заявки на изобретение

(21) Заявка № 2020121251/14(036275)

Дата поступления документов заявки 22.06.2020

(22) Дата подачи заявки 22.06.2020

(71) Заявитель(и) федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Мичуринский государственный аграрный университет", RU

(54) Название изобретения СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ BLV-ИНФЕКЦИИ У
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

1	ППД 22.06.2020 ЛГТ 22.06.2020	200142
---	----------------------------------	--------



ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ
ВХОД. № 72-47/2023
ДАТА 23 ИЮН 2020

ДИПЛОМ

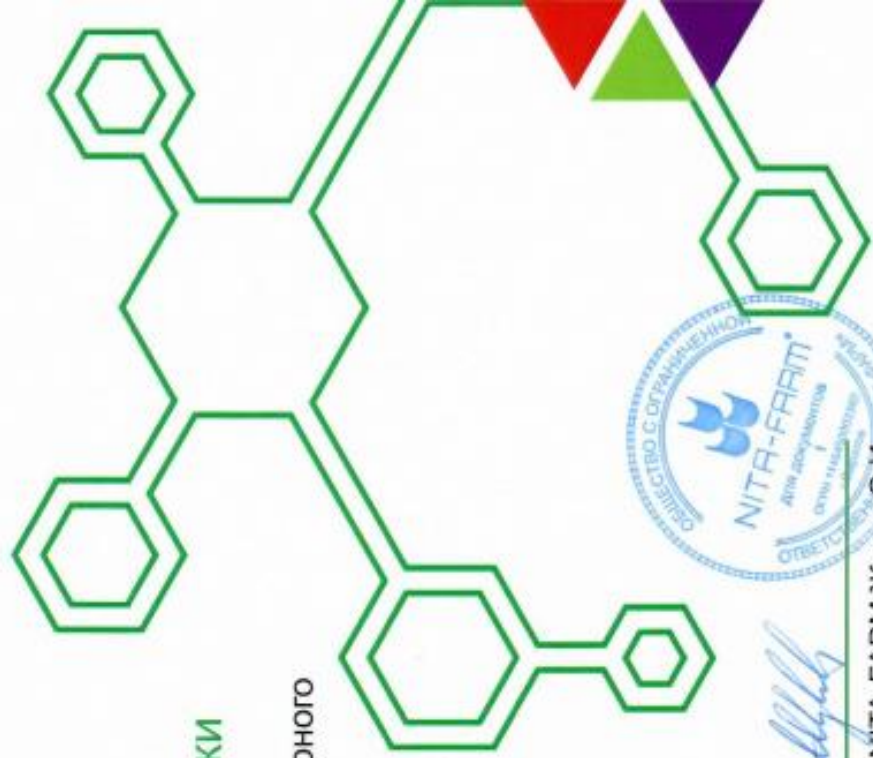
за 2 место

в Конкурсе на лучшую студенческую или аспирантскую работу в области ветеринарии и ветеринарной фармацевтики

награждается студент Саратовского государственного аграрного университета имени Н.И. Вавилова

Белякова Анастасия Сергеевна

Работа на тему:
«Совершенствование диагностики лейкоза крупного рогатого скота»



Директор NITA-FARM Жуков О.И.