

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Саратов 2020

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

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, доцент
Красников Александр Владимирович

**Официальные
оппоненты:** **Крячко Оксана Васильевна,**
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет
ветеринарной медицины», заведующая
кафедрой патологической физиологии

Абакин Сергей Стефанович,
кандидат ветеринарных наук, доцент,
Всероссийский научно-исследовательский
институт овцеводства и козоводства -
филиал ФГБНУ «Северо - Кавказский
Федеральный Научный Аграрный центр»,
ведущий научный сотрудник лаборатории
ветеринарной медицины

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Новосибирский
государственный аграрный университет»

Защита состоится «26» февраля 2021 года в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК № 3, диссертационный зал.

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

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1, ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, ученому секретарю диссертационного совета E-mail: vetdust@mail.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук,
доцент

Егунова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) является одной из наиболее актуальных дилемм последнего столетия (П.Н. Смирнов с соавт, 2020). 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 (O. Nekouei et al., 2016), высоким уровнем инфекционных заболеваний (N. Sandev et al., 2004) и репродуктивных нарушений (P.C. Bartlett et al., 2013). Вопреки всем попыткам, так и не удалось разработать достаточно эффективные экономически обоснованные способы предотвращения распространения этого заболевания среди животных (A. Abdala et al., 2019). Кроме того, в последние годы появляется все больше сообщений о возможной роли bovine leukemia virus (*BLV*) в возникновении онкопатологии у женщин (L.M. Cuesta et al., 2018), при этом доказано, что вирус присутствует в эпителии молочной железы (G.C. Vuehring et al., 2014). Известно, что многие вирусы, в том числе и онкогенные, естественным образом преодолевают межвидовой барьер, и, попав в гетерологичную популяцию, приобретают свойство распространяться в ней (L. Christou, 2011). 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 (S.M. Rodriguez et al., 2011; L.C. Lee et al., 2012). 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 (E.S. Krasnikova et al., 2018; П.Н. Смирнов с соавт, 2020). Достаточно подробно изучены структура и функции генома *BLV* (M. Polat et al., 2017). Показана возможность передачи возбудителя кроликам (М.И. Гулюкин с соавт, 2015) и лабораторным крысам (E.S. Krasnikova et al., 2019). 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. 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 (Г.А. Горячева и А.А. Грицын, 2013; М.И. Гулюкин с соавт., 2016). 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 (Р.В. Радионов, 2019).

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 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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 клинко-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, при свободном доступе к воде. 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).

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*-инициированного крупного рогатого скота с интервалом в 1 неделю. Животным контрольной группы (n=10) вводили стерильный физиологический раствор по той же схеме.

Молекулярно-генетические исследования крови взрослых крыс осуществляли через 2 недели после первого инфицирования, потомства экспериментальных животных – на момент первого гематологического исследования. Для экстракции и очистки нуклеиновых кислот применяли набор «ДНК Сорб В» (ИЛС, Россия). *BLV*-инфекцию у крыс подтверждали методом ПЦР с использованием набора «Лейкоз» (ИЛС, 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 у животных 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; гемоглобина; средний объем эритроцитов; ширина распределения эритроцитов по объему; количество тромбоцитов; лейкоцитов; относительная концентрация лимфоцитов; средних клеток крови, гранулоцитов и средний объем тромбоцитов.

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, креатинина, глюкозы, общего белка, альбумина, билирубина, активность ферментов амилазы, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы.

Для определения иммунного статуса крыс, сыворотку крови исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с тест-системами фирмы «Цитокин» (Россия) на оборудовании Thermo Fisher Scientific (США). Анализировали такие показатели, как содержание IL-1 β и его антагониста IL-1Ra, компонентов C3 и C4 комплемента, протеолитических продуктов системы комплемента C3a и C5a.

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). Различия 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.

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



Рисунок 1 – Схема выполнения научных исследований.

Результаты исследований и их обсуждение

Динамика гематологического статуса лабораторных крыс при экспериментальной BLV-инфекции

При сравнительной оценке данных гематологических исследований мы принимали во внимание референсные значения для крыс линии Wistar, однако эталонными считали результаты исследований контрольных групп животных.

Динамика показателей общего и биохимического анализов крови взрослых крыс представлена в таблицах 1 и 2, показателей их потомства - в таблицах 3 и 4

Таблица 1 - Данные общего анализа крови взрослых крыс, (M±m)

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: * - статистически значимые различия опытной группы от контрольной (P ≤ 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 биохимического анализа крови крыс, (M±m)

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, мкмоль/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: * - статистически значимые различия 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 3 - Данные общего анализа крови потомства инфицированных крыс, (M±m)

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: * - статистически значимые различия опытной группы от контрольной ($P \leq 0,05$).

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 3, 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%.

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 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.

Таблица 4 - Данные биохимического анализа крови потомства крыс, (M±m)

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*
Билиру-бин 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: * - статистически значимые различия опытной группы от контрольной ($P \leq 0,05$).

Сравнительный анализ данных выполненных нами ранее гематологических исследований крови крыс, зараженных BLV пероральным путем с молоком инфицированных и больных лейкозом коров, позволяют заключить, что при внутрибрюшинном способе заражения их лимфоцитами, характерные для лейкозной инфекции признаки развиваются у крыс более динамично.

Динамика цитокинового статуса лабораторных крыс при экспериментальной BLV-инфекции

Набор анализируемых нами маркеров позволяет дать многопараметрическую оценку иммунному статусу крыс: IL-1 β – провоспалительный цитокин и его антагонист IL-1Ra; C4 компонент активирующий иммунитет по классическому пути и C3 – по альтернативному и классическому; анафилатоксины C3a и C5a.

Динамика содержания исследуемых гуморальных факторов иммунитета (M±m) в сыворотке крови крыс и их потомства опытной и контрольной групп приведены в таблицах 5 и 6.

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
C3, нг/мл	0,050 \pm 0,006	0,049 \pm 0,005	0,051 \pm 0,005	0,052 \pm 0,004
C4, нг/мл	0,364 \pm 0,029*	0,308 \pm 0,003	0,272 \pm 0,031*	0,312 \pm 0,003
C3a, нг/мл	0,071 \pm 0,008	0,065 \pm 0,005	0,082 \pm 0,010*	0,072 \pm 0,007
C5a, нг/мл	0,245 \pm 0,003*	0,092 \pm 0,011	0,613 \pm 0,059*	0,087 \pm 0,013

Примечание: * - статистически значимые различия опытной группы от контрольной ($P \leq 0,05$).

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. 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. 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. Содержание компонента комплемента C4 при первом исследовании сыворотки крови, у животных экспериментальной группы было на 18% выше, чем в контроле, но через 6 месяцев с момента заражения содержание фракции C4 было на 15% меньше, чем в контроле. Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что в момент заражения и развития вирусемии 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.

Содержание фрагмента C3a в начале эксперимента не имело достоверных отличий у животных опытной и контрольной групп, однако к окончанию эксперимента C3a обнаруживался у крыс экспериментальной группы в большем количестве, чем у контрольной группы животных (на 14%). Содержание C5a фракции в сыворотке крови опытной группы животных уже на момент первого исследования было в 2,7 раз выше, чем в контроле, а на момент окончания эксперимента превышало показатели контроля в 7 раз. Фрагменты C3a и C5a являются анафилотоксинами - промоутерами острого воспаления, активирующими: нейтрофилы, тучные клетки, клетки эндотелия, то есть маркерами 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
C3, нг/мл	0,047 \pm 0,004	0,050 \pm 0,005	0,049 \pm 0,005	0,052 \pm 0,004
C4, нг/мл	0,279 \pm 0,031	0,306 \pm 0,009	0,359 \pm 0,038*	0,309 \pm 0,011
C3a, нг/мл	0,076 \pm 0,007*	0,066 \pm 0,007	0,075 \pm 0,009*	0,064 \pm 0,006
C5a, нг/мл	0,122 \pm 0,011*	0,106 \pm 0,009	0,131 \pm 0,059*	0,112 \pm 0,011

Примечание: * - статистически значимые различия опытной группы от контрольной ($P \leq 0,05$).

Как следует из данных, представленных в таблице 6, содержание IL-1 β у потомства инфицированных крыс, хотя несколько и возросло 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 коррелируют с результатами исследований иммунологического статуса КРС при BLV-инфекции, представленные в литературных источниках и свидетельствующие о развитии у животных иммунной супрессии на клеточном и гуморальном уровнях.

Разработка нового способа моделирования BLV-инфекции

Поставленная перед нами задача, заключалась 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.

Для ее решения, 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 монуноклеаров и *extempore* вводили полученную фракцию монуноклеаров, разведенную стерильным физиологическим раствором по стандарту мутности МакФарланда (R092В стандарт 1 ед.), в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно 5-6-и месячным крысам линии Wistar двукратно с интервалом в 1 неделю. Контроль заражения осуществляют методом ПЦР с кровью экспериментальных животных.

По результатам наших разработок была сформирована заявка на патент РФ на изобретение (№ 2019110652 от 10.04.2019). 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 результат в короткие сроки.

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 иллюстрирует рисунок 1.

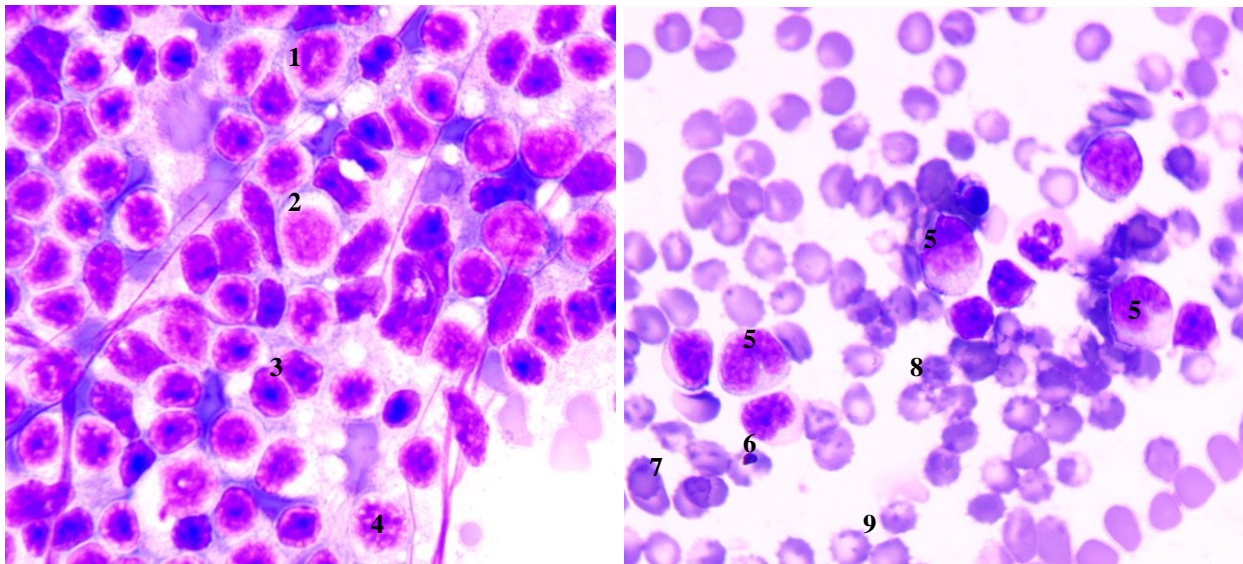


Рисунок 1 - Патологические формы лимфоцитов и эритроцитов.
Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

На рисунке 1 показано присутствие в мазках-отпечатках из селезенки *BLV*+ крыс миелобластов (1), атипичных промиелоцитов (2), реактивных лимфоцитов (3), «беркиттоподобных» клеток (4) и других опухолевых форм лимфоцитов (5), а также наличие телец Кебо (6), Жоли (7) и Папенгеймера (8) в эритроцитах и эритроцитов с «изъеденными» краями (9).

Комплексная оценка цитограммы мазков-отпечатков селезенки позволила выявить присутствие в органе признаки таких патологических

состояний, как гиперплазия, мастоцитомы, аденокарцинома и фибросаркома селезенки, что иллюстрируют рисунки 2-3.

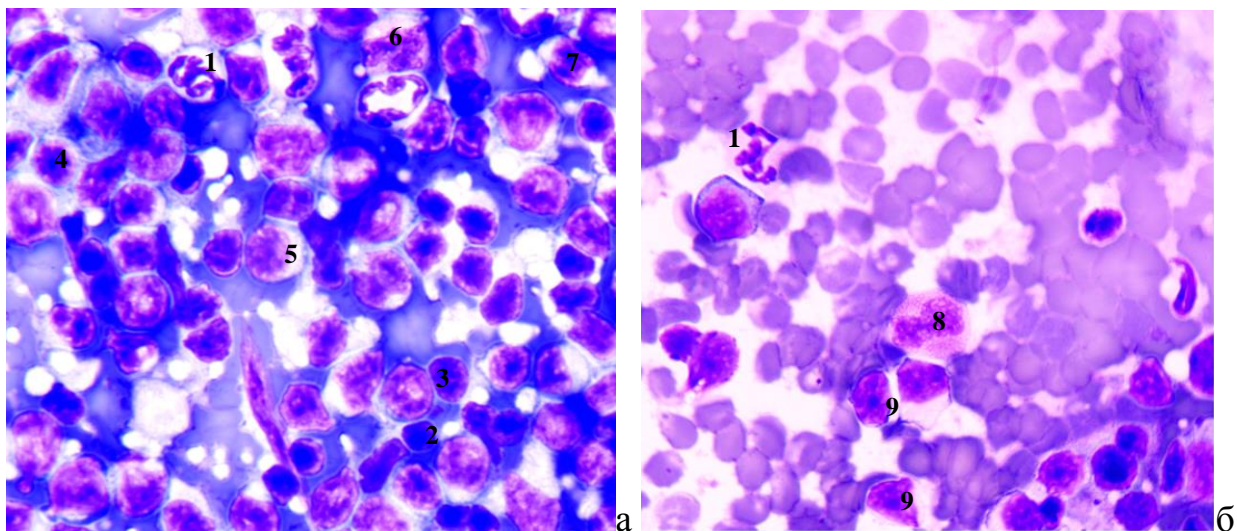


Рисунок 2 - Цитологическая картина гиперплазии селезенки (а) и аденокарциномы селезенки (б). Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

При гиперплазии селезенки (2а) в цитогамме на фоне базофильного межклеточного вещества и клеток воспаления нейтрофилов (1), обнаружены зрелые лимфоциты (2), лимфобласты и центробласты (3), центроциты (4), а также плазматические клетки (5), мастоциты (6) и гистиоциты (7).

В цитогамме аденокарциномы селезенки (рис. 2б) на фоне клеток воспаления: нейтрофилов (1) и эозинофилов (8) были обнаружены атипичные клетки эпителиального происхождения с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, пологональными эксцентрично расположенными ядрами с 1-2 увеличенными ядрышками (9).

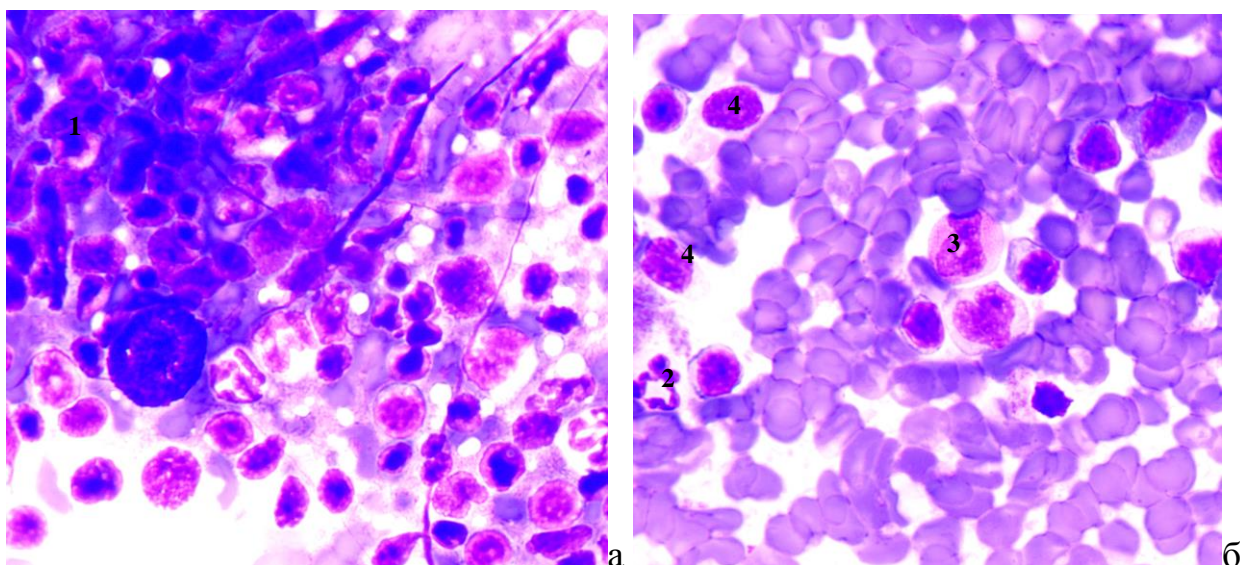


Рисунок 3 - Цитологическая картина мастоцитомы селезенки (а) и фибросаркомы селезенки (б). Окраска азуром и эозином. Ув. x1000.

При фибросаркоме селезенки (рис. 3а) в цитогамме были обнаружены атипичные клетки мезенхимального происхождения (1) с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Крупные и средние

клетки полигональной и вытянутой формы с вакуолизированной базофильной цитоплазмой располагались скоплениями. Их средние и крупные ядра вытянутой формы с неравномерно распределенным темnobазофильным хроматином имели неровную утолщенную ядерную оболочку и 2-3 увеличенных ядрышка.

Цитологическая картина мастоцитомы селезенки (рис. 3а) характеризовалась присутствием на фоне клеток воспаления – нейтрофилов (2) и эозинофилов (3), атипичных клеток мезенхимального происхождения (4) с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Крупные и средние клетки округлой и полигональной формы располагались разрозненно. Скудная цитоплазма клеток содержала азурофильные гранулы. Эксцентрично расположенные ядра округлой формы имели мелкозернистый, неравномерно распределенный базофильный хроматин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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 рекомендации

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 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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. 53-58.

5. 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. 76-81.

6. 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. - №12. – С. 58-61.

Статьи, индексируемые в Scopus / Web of Science

7. The hematobiochemical status of Wistar rat line under the bovine leukemia virus experimental infection / Е.С. Krasnikova, **A.S. Belyakova**, F. Bouchemla, А. V. Krasnikov, R. V. Radionov // Veterinary World. - 2019. - Т. 12. - № 3. - С. 382-388.

Патенты

8. 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.

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

Публикации в других изданиях

10. **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.

11. 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.

12. **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.

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

14. 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.

15. **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.

16. 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.

17. **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.

18. 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.

19. **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>.

20. **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>.

21. **Белякова, А.С.** Состояние факторов $\Pi-1\beta$ и $\Pi-1Ra$ 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. Т. 2. С. 209-213.

22. **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. Т. 2. С. 213-216.