

## ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОСПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ПРИ ИЗУЧЕНИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

**Александр Владимирович Красников,**

д.в.н., доцент, заведующий

кафедры «Зоотехния и ветеринария»

Мичуринский государственный аграрный университет,

г. Мичуринск, РФ

krasnikov.77@mail.ru

**Сергей Васильевич Козлов,**

д.в.н., доцент, доцент кафедры

«Болезни животных и ВСЭ»

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

г. Саратов, РФ

kozlovsv12@yandex.ru

**Дмитрий Алексеевич Артемьев,**

аспирант, ассистент кафедры

«Болезни животных и ВСЭ»

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

г. Саратов, РФ

ahdnvj@mail.ru

**Аннотация.** Целью исследования явилось использование микроспектрального анализа для изучения лимфоцитов крупного рогатого скота при энзоотическом лейкозе и вирусном иммунодефиците, что имеет значение для диагностики и дифференциальной диагностики болезней, а также для оценки состояния гомеостаза организма животного и составления прогноза заболевания. Для *BIV*, *BLV* и *BLV/BIV*-инфицированных животных соотношение кислотных и основных компонентов в клетке в среднем составил;  $1,34 \pm 0,06$ ,  $1,51 \pm 0,08$  и  $2,13 \pm 0,11$ , то есть оказался в 1,6; 1,8 и 2,6 раз

выше, чем у интактных, что может являться индикатором метаболического ацидоза в клетке.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, лимфоциты, спектрофотометрия, микроскопия, лейкемия, иммунодефицит, гомеостаз.

Проблема энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС), с момента выделения заболевания в самостоятельную нозологическую единицу, является одной из первостепенных для сельского хозяйства. Выявление еще одного ретровирусного заболевания – вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота (ИД КРС), стало важным открытием в области ветеринарной нозологии. Известно, что инфицированные ретровирусами клетки животных, так же как злокачественно-трансформированные, приобретают отличные от здоровых биофизические и морфофункциональные свойства [4, 11].

Для исследования звеньев эффекторно-аффлекторных механизмов в кинетике иммунного ответа с феноменом антителозависимого усиления инфекции, обусловленный образованием комплекса рецептора возбудителя с Fc-фрагментом на поверхности фагоцитирующих клеток, результатом чего является размножение микроорганизма в фагоцитах подходит люминесцентно-микроскопический метод исследования [1,2,7]. Данный метод основан на поглощении монохроматического излучения. Способность регистрировать, с помощью данного метода, ранние биохимические и морфофункциональные сдвиги (фотохимические изменения), развивающиеся в клеточных структурах до возникновения клинической и патоморфологической картины, определенно является приоритетом для дифференциальной диагностики заболеваний на ранних этапах их развития.

**Цель** данного исследования – сравнительная оценка морфофункционального состояния агранулоцитов BLV, BIV и BLV/BIV – инфицированных и интактных животных с помощью микроспектрального анализа.

Для достижения указанной цели были определены следующие **задача**:

1. Выполнить спектрофотометрический анализ выделенных клеточных субпопуляций агранулоцитов от *BLV*, *BIV*, *BLV/BIV*– инфицированного и интактного, крупного рогатого скота, а также провести сравнительный

анализ полученных результатов.

### **Материал и методы исследования.**

Исследования проводились на базе межкафедральной научно-исследовательской лаборатории «ГЕНОМ» и ЦКП «Молекулярная биология» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. **Материал:** периферическая кровь крупного рогатого скота из КХ «Заря» Тамалинского района Пензенской области. **Объект исследования:** агранулоциты (лимфоциты) интактного (n=30), BLV-инфицированного (n=30), BIV-инфицированного (n=30), BLV/BIV инфицированного крупного рогатого скота (n=30).

**Методы исследования.** Диагноз «BLVи / или BIVинфекция» основывался на данных госветслужбы и лабораторных исследованиях с использованием ПЦР набора «ЛЕЙКОЗ» (InterLabServis, Россия) и собственных разработок (патент № 2615465) на оборудовании BioRad T100 и Gel Doc XR (USA).

Выделение рабочей фракции агранулоцитов периферической крови выполняли по следующей схеме:

Наслоение 2–3 мл периферической крови на градиент плотности Фиколл-Урографин ( $1,077 \text{ г./см}^3$ ) в соотношении 1:1 с последующим центрифугированием при 3000 об./мин в течение 30 мин для разделения фракций форменных элементов в градиенте плотности и сбора лимфоцитов из кольца, образовавшегося между и плазмой и градиентом плотности в отдельную пробирку. После добавление фосфатно-солевого буфера (PBS, Росмедбио РМБ) в объеме 1 мл с последующим трехкратным ресуспендированием и центрифугированием при 1800 об./мин в течение 5 мин, для очистки от остатков градиента плотности.

Приготовление разведения фракции лимфоцитов осуществляли по стандарту мутности Макфарланда (0,5) на PBS. Равномерно распределяли и высушивали 1 каплю клеточной взвеси на обезжиренном предметном стекле. Фиксировали и окрашивали полученный препарат набором реагентов Лейкодиф 200 (LDF 200) по стандартной методике. Спектральный анализ

агранулоцитов осуществляли с помощью универсального цветоанализатора микроскопа-спектрофотометра ЛОМО МСФУ-К (Россия). Замеры производили при использовании штатного монохроматора МСФУ-К при мощности 800А с шагом измерения 0,5 нм и диаметром точки сканирования  $10^{-4}$  мм при 480-и кратном увеличении (12x40). Регистрировали величину интенсивности поглощения светового пучка ( $I\lambda$ ) в видимой области спектра при спектральной ширине ( $\delta\lambda$ ) 300 – 700 нм. По полученным данным определяли степень поглощения окрашенных лимфоцитов в спектре эозина У и азура II. Статистическая обработка цифровых данных включала определение средней арифметической ( $M$ ) и ошибки средней арифметической ( $m$ ). Различие контроля и опытных групп считали статистически достоверными при  $P \leq 0,05$ .

Методом микроспектрального анализа были измерены степень и диапазоны поглощения монохроматического светового пучка окрашенными лимфоцитами периферической крови исследуемых животных. По полученным данным были рассчитаны коэффициенты соотношения оксифильных и базофильных компонентов в них. Эозин У, входящий в состав набора для окрашивания «Лейкодиф 200», относят к кислотным красителям, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной (белковой) природы. Спектр поглощения чистого органического красителя эозина – 470 нм. Другой компонент красящего раствора, азур II, является основным красителем, используется для окраски структур, богатых нуклеиновыми кислотами (ядра, ядрышки, рибосомы), а также аморфного компонента межклеточного вещества, со спектром поглощения в диапазоне 620–665 нм. При окрашивании биологических объектов часто наблюдается явление метахромазии, что может быть связано с взаимодействием красителей между собой и зависит от кинетики биологических процессов в клетке, поэтому диапазон поглощения варьирует [3,6,8].

**Результаты исследования.** Для лимфоцитов коров с сочетанной патологией (*BLV/BIV*) значения поглощения ( $I\lambda$ ) в спектре эозина У и азура

II составили  $351,2 \pm 17,6$  и  $751,4 \pm 37,6$  counts соответственно. Для животных с *BLV* и *BIV* моно-инфекцией эти показатели составили  $253,3 \pm 12,7$ ;  $383,3 \pm 19,2$  и  $371,5 \pm 18,5$ ;  $500,2 \pm 24,9$  counts соответственно. В то время как у интактных коров данные показатели регистрировались на уровне  $210,3 \pm 10,5$  и  $173,6 \pm 8,6$  counts. Интенсивность поглощения светового пучка определенной длины волны окрашенными клетками тем выше, чем больше концентрация вещества в клетке, окрашенного красителем, диапазон поглощения которого находится в известных пределах, используя полученные данные возможно рассчитать соотношение основных и кислых компонентов в клетке.

Ядерно-цитоплазматическое отношение является важной морфологической характеристикой, позволяющей оценить уровень метаболизма и выявить проявление компенсаторных реакций в клетке. Мононуклеары крови характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Однако этот показатель не тождественен соотношению базофильных и оксифильных клеточных компонентов, который на наш взгляд является более информативным, так как отражает не столько структурные особенности, сколько функциональное состояние клетки.

По нашим данным у интактных животных соотношение кислотных и основных компонентов в клетке было равномерно пропорциональным, то есть коэффициент соотношения составил  $0,83 \pm 0,04$ . Для *BIV*, *BLV* и *BLV/BIV*-инфицированных животных этот коэффициент в среднем составил;  $1,34 \pm 0,06$ ,  $1,51 \pm 0,08$  и  $2,13 \pm 0,11$ , то есть оказался в 1,6; 1,8 и 2,6 раз выше, чем у интактных. Однако утверждать, что в клетке резко увеличилось содержание нуклеиновых кислот мы не можем, так как азур II окрашивает все базофильные структуры, включая аморфный компонент межклеточного вещества. Кроме того, АСМ-сканирование лимфоцитов крупного рогатого скота с ретровирусной инфекцией не выявило столь значительных морфотопографических изменений по сравнению с интактными животными [5, 9,10].

То есть можно предположить, что в данном случае в клетке развивается

метаболический ацидоз. В данном случае в равной степени это может быть обусловлено продукцией вирусных частиц и поликлональной пролиферацией лимфоцитов. Причиной метаболического ацидоза служит накопление кетоновых тел и других недоокисленных промежуточных метаболитов. Вероятно, что предрасполагающим фактором является токсичное действие вирусных белков в инфицированных лимфоцитах. Полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют прямую корреляцию с результатами выполненных нами гематологических исследований и свидетельствуют об изменении гомеостаза организма инфицированных животных, в том числе и на уровне клетки.

**Заключение.** Таким образом, в инфицированных ретровирусами лимфоцитах содержание базофильных веществ в 1,6 – 2,6 раз превышает таковое у интактных, что может являться индикатором метаболического ацидоза. Ориентируясь на вышеприведенные данные, мы считаем, что зарегистрированные нами отклонения были вызваны структурно-метаболическими изменениями в клетках, по которым можно оценивать инфекционный статус и состояние гомеостаза организма животного.

#### Список литературы

1. Донник И.М. Определение динамики распространенности лейкоза крупного рогатого скота на территории российской федерации // Аграрный вестник Урала. 2013. № 1 (107). С. 25–27.
2. Красникова Е.С., Агольцов В.А., Кудинов А.В. Гемато-биохимический статус коров при *BLV*- и *BIV*-инфекции // Научная жизнь. 2016. № 2. С. 159–167.
3. Martinez Cuesta L., Lendez P.A., Nieto Farias M.V., Dolcini G.L., Ceriani M.C. Can Bovine Leukemia Virus Be Related to Human Breast Cancer? A Review of the Evidence // J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2018. No. 23(3). Pp. 101–107.
4. Gazon H., Chauhan P., Hamaidia M., Hoyos C., Li L., Safari R., Willems L. How Does HTLV-1 Undergo Oncogene-Dependent Replication Despite a

Strong Immune Response? // *Front. Microbiol.* 2017. No. Pp. 2684.

5. Buehring G.C., DeLaney A., Shen H., Chu D.L, Razavian N., Schwartz D.A., Demkovich Z.R., Bates M.N. Bovine leukemia virus discovered in human blood // *BMC Infect Dis.* 2019. No. 19(1). doi:10.1186/s12879-019-3891-9.

6. Abdessemed D., Krasnikova E.S, Agoltsov V.A., Krasnikov A.V. Population and biological preconditions for the cattle retroviruses' expansion // *Theoretical and Applied Ecology.* 2018. No. 3. Pp. 116–124.

7. Schwingel D., Andreolla A., Erpen L., Frandoloso R., Carlos K. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil // *Scientific Reports.* 2019. No. 9(1). Pp. 2949.

8. Khalilian M., Hosseini S.M., Madadgar O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women // *Microbial Pathogenesis.* 2019. No.135. Pp. 103566.

9. Baltzell K.A., Shen H.M., Krishnamurthy S., Sison J.D., Nuovo G.J., Buehring G.C. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas // *Cancer.* 2018. No. 124(7). Pp. 1342–1349.

10. Buehring G.C., Shen H., Schwartz D.A., Lawson J.S. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development // *PloS one.* 2017. No. 2(6). P. 0179367.

11. Frie M.C., Coussens P.M. Bovine Leukemia Virus: A Major Silent Threat to Proper Immune Responses in Cattle // *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2015. No. 163(3–4). Pp. 103–114.



# POSSIBILITIES OF MICROSPECTRAL ANALYSIS IN THE STUDY OF CELL METABOLISM

**Alexander V. Krasnikov,**

Doctor of Medical Sciences, Associate Professor,

Head of the Department of

«Zootechnics and Veterinary Medicine»

Michurinsk State Agrarian University,

Michurinsk, Russia

krasnikov.77@mail.ru

**Sergey V. Kozlov,**

PhD,

Associate Professor, Associate Professor

of the Department of Animal

Diseases and Veterinary-Sanitary Expertise

Saratov State Agrarian University,

Saratov, Russia

kozlovsv12@yandex.ru

**Dmitry A. Artemyev,**

post-graduate student, assistant of

the Department of Animal Diseases and

Veterinary-Sanitary Expertise

Saratov State Agrarian University

Saratov, Russia

ahdnvj@mail.ru

**Annotation.** The purpose of the study was to use Microspectral analysis to study bovine lymphocytes in enzootic leukemia and viral immunodeficiency, which is important for the diagnosis and differential diagnosis of diseases, as well as for assessing the state of homeostasis of the animal body and making a

prognosis of the disease. For BIV, BLV and BLV/BIV-infected animals, the ratio of acidic and basic components in the cell averaged;  $1.34\pm 0.06$   $1.51\pm 0.08$  and  $2.13\pm 0.11$ , that is, it turned out to be 1.6; 1.8 and 2.6 times higher than in intact cells, which may be an indicator of metabolic acidosis in the cell.

**Keywords:** cattle, lymphocytes, spectrophotometry, microscopy, leukemia, immunodeficiency, homeostasis