

Использование микроспектрального анализа для оценки морфофункционального статуса иммунокомпетентных клеток при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота

А. В. Красников¹, Д. А. Артемьев², Е. С. Красникова^{1✉}, С. В. Козлов²

¹ Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия

² Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов, Россия

✉ E-mail: krasnikovaes77@yandex.ru

Аннотация. Микроспектральный анализ является высокоинформативным способом оценки морфофункционального состояния клеток, в том числе иммунокомпетентных. **Целью** исследования явилось использование его для изучения лимфоцитов крупного рогатого скота при энзоотическом лейкозе и вирусном иммунодефиците, что имеет значение для лабораторной диагностики и дифференциальной диагностики болезней, а также для оценки состояния гомеостаза организма животного и составления прогноза заболевания. Лейкоз и иммунодефицит относят к гематопатологическим процессам. Поэтому в качестве **компаративного метода** мы использовали гематологический метод исследования. Спектральный анализ окрашенных набором Лейкодиф 200 агранулоцитов осуществляли с помощью универсального цветоанализатора микроскопа-спектрофотометра ЛОМО МСФУ-К. Регистрировали величину интенсивности поглощения светового пучка в области спектра от 300 до 700 нм. **Результаты** микроспектрального анализа показали, что для лимфоцитов коров с сочетанной патологией (*BLV/BIV*) значения поглощения 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*-моноинфекцией 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. В то время как у интактных коров данные показатели регистрировались на уровне $210,3 \pm 10,5$ и $173,6 \pm 8,6$ counts. 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 раза выше, чем у интактных, что может являться индикатором метаболического ацидоза в клетке. **Научная новизна** заключается в том, что впервые выявленные нами методом микроспектрального анализа изменения, свидетельствующие об изменении гомеостаза организма инфицированных животных на уровне клетки, коррелировали с результатами гематологических исследований, обнаруживших признаками гипоксии и воспаления.

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

Для цитирования: Красников А. В., Артемьев Д. А., Красникова Е. С., Козлов С. В. Использование микроспектрального анализа для оценки морфофункционального статуса иммунокомпетентных клеток при ретровирусных заболеваниях крупного рогатого скота // Аграрный вестник Урала. 2020. № 06 (197). С. 58–65. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-197-6-58-65.

Дата поступления статьи: 24.12.2019.

Постановка проблемы (Introduction)

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. По мнению ряда отечественных и зарубежных исследователей, ввиду тесного филогенетического родства ретровирусов крупного рогатого скота между собой и с возбудителями Т-клеточного лейкоза и вирусного имму-

нодефицита человека проблема имеет общебиологическое и медицинское значение [1, с. 26], [2, с. 159], [3, с. 102, 105], [4], [5], [6, с. 117]. Так, по данным [10], ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (*BLV*) с помощью ПЦР и секвенирования была обнаружена в лейкоцитарных клетках крови у 38 % исследованных людей. Антитела IgG были обнаружены у 32 %, IgM – у 58 %, IgA – у 32 % субъектов [5]. В научных трудах Martinez Cuesta L et al. (2018) обсуждается проблема вероятности развития злокачественных новообразований у людей, в организме которых обнаружен *BLV* [3].

Ряд авторов рассматривает данный агент как фактор, потенциально предрасполагающий к раку молочной железы у женщин [7], [8], [9, с. 1348], [10]. Важным аспектом является и тот факт, что ЭЛ и ВИ КРС можно рассматривать как «заболевания-спутники» [2, с. 165, 166]. По мнению D. Abdessemed et al. (2018), инфицирование крупного рогатого скота вирусом иммунодефицита (*BIV*) повышает риск заражения животных *BLV*, то есть высокая вероятность микст-инфекции [6, с. 121, 122].

Согласно наиболее приемлемой в настоящее время теории, ретровирусы, используя различные механизмы воздействия на клеточный метаболизм, активируют пролиферацию инфицированных клеток, провоцируя при этом нестабильность генома и соматические изменения в клетках-носителях [4]. Данная стратегия позволяет возбудителям осуществлять ретровирусную экспансию по двум направлениям: следствием пролиферации является «клонирование» ДНК провируса. Кроме того, репликация инфекционных РНК-содержащих вирусных частиц наиболее интенсивно происходит в активно размножающихся клетках, нежели в покоящихся. Повышенная экспрессия мРНК в инфицированных лимфоцитах сопровождается значительными изменениями в продукции цитокинов и экспрессии антигенов иммунными клетками [11, с. 104–106]. При этом установлено, что клетки животных с высоким индексом поликлональной пролиферации обладают повышенной жизнеспособностью [12, с. 43].

Стратегия ретровирусов в зараженной клетке в настоящее время является объектом пристального внимания исследователей во всем мире. Одни вирусные белки демонстрируют диффузное цитоплазматическое распределение, другие локализируются в ядрышках [13, с. 159]. Вопрос перераспределения продуктов биосинтеза в инфицированных ретровирусами клетках является актуальным научным аспектом ветеринарной и гуманной медицины, он важен для развития современных подходов к диагностике, дифференциальной диагностике и составлению прогнозов при гематопатологических процессах.

Известно, что инфицированные ретровирусами клетки животных, так же как злокачественно-трансформированные, приобретают отличные от здоровых биофизические и морфофункциональные свойства [14], [15]. В настоящее время исследования морфофункционального состояния клеток периферической крови, в частности лейкоцитов, проводятся при различных инфекционных заболеваниях [16], [17], [18]. Это обусловлено как минимум двумя факторами. Во-первых, белые клетки крови являются ключевым звеном эффекторно-аффлекторных механизмов в кинетике иммунного ответа [11, с. 105, 106], [14]. А во-вторых, для ретровирусов, в частности группы лентивирусов, к которым относится возбудитель ВИ КРС, характерным является феномен антителозависимого усиления инфекции, обусловленный образованием комплекса рецептора возбудителя с Fc-фрагментом на поверхности фагоцитирующих клеток, результатом чего является размножение микроорганизма в фагоцитах [19, с. 80].

Перспективным для решения данной задачи является люминесцентно-микроскопический метод исследования. Данный метод основан на поглощении монохроматра-

фического излучения, т. е. излучения с одной длинной волны в видимом и ультрафиолетовых областях спектра. В частности, с помощью данного метода исследования установлена закономерность конформационных изменений в структуре гемоглобина при лейкозе крупного рогатого скота [20, с. 236]. 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 **задачи**:

1. Осуществить общий анализ крови интактного и инфицированного крупного рогатого скота.
2. Выделить фракцию лимфоцитов периферической крови от *BLV*-, *BIV*-, *BLV/BIV*-инфицированного и интактного крупного рогатого скота.
3. Выполнить спектрофотометрический анализ выделенных клеточных субпопуляций агранулоцитов.
4. Провести сравнительный анализ полученных результатов.

Методология и методы исследования (Methods)

Исследования проводились на базе межкафедральной научно-исследовательской лаборатории «ГЕНОМ» и ЦКП «Молекулярная биология» Саратовского 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. Аспирация крови была произведена из подхвостовой вены (*V. caudalis*) вакуумной системой в пробирки с антикоагулянтом КЗ ЭДТА Пробирки транспортировали в лабораторию при температуре +4...+8 °С.

Диагноз «*BLV*- и/или *BIV*-инфекция» 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).

Исследование общего анализа крови было выполнено на автоматическом гематологическом анализаторе MicroCC 20 Vet (HTI, USA).

Выделение рабочей фракции агранулоцитов периферической крови выполняли по следующей схеме:

1. Наслоение 2–3 мл периферической крови на градиент плотности фиколл-урографин (1,077 г/см³) в соотношении 1:1.
2. Центрифугирование при 3000 об/мин в течение 30 минут для разделения фракций форменных элементов в градиенте плотности.

Таблица
Данные ОАК интактных и инфицированных ретровирусами животных, ($M \pm m$)

Показатели	Интактные животные (n = 30)	BLV-инфицированные (n = 30)	BIV-инфицированные (n = 30)	BLV/BIV-инфицированные (n = 30)	Референсные значения
Гемоглобин, г/л	110,51 ± 5,52	92,21 ± 4,37*	96,71 ± 4,82*	83,01 ± 4,17*	90–120
Гематокрит, %	42,53 ± 4,31	35,36 ± 3,72*	38,86 ± 3,95*	31,86 ± 3,12*	35–45
СОЭ, мм/ч	5,31 ± 0,51	14,4 ± 1,41*	15,82 ± 1,61*	13,0 ± 1,11*	0–15
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,54 ± 0,51	5,35 ± 0,81*	5,83 ± 0,91*	4,85 ± 0,51*	5–7,5
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	380,66 ± 36,52	635,34 ± 53,51*	698,34 ± 57,51*	571,84 ± 49,51*	260–700
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	11,50 ± 1,50	19,52 ± 1,76*	25,58 ± 1,93*	23,06 ± 1,56*	4,5–12
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,10 ± 0,01	0,80 ± 0,09*	0,90 ± 0,09*	0,70 ± 0,10*	0–2
Базофилы, 10 ⁹ /л	0,10 ± 0,01	1,24 ± 0,41*	1,54 ± 0,31*	1,12 ± 0,21*	0–2
Юные нейтрофилы, 10 ⁹ /л	0,0 ± 0,0	1,41 ± 0,32*	1,91 ± 0,41*	1,71 ± 0,22*	0–1
Палочкоядерные нейтрофилы, 10 ⁹ /л	0,40 ± 0,01	1,23 ± 0,41*	2,23 ± 0,47*	1,53 ± 0,35*	2–5
Сегментоядерные нейтрофилы, 10 ⁹ /л	3,71 ± 0,32	5,54 ± 0,62*	6,54 ± 0,52*	7,54 ± 0,42*	5–25
Моноциты, 10 ⁹ /л	2,00 ± 0,30	1,33 ± 0,21*	2,33 ± 0,11*	1,35 ± 0,11*	2–5
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	5,27 ± 0,52	8,13 ± 0,89*	10,13 ± 1,12*	9,11 ± 0,99*	5–9

Примечание: * Различия статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10).

Table
The data of clinical blood analysis of intact and retrovirus-infected animals, ($M \pm m$)

Indicators	Intact animals (n = 30)	BLV-infected (n = 30)	BIV-infected (n = 30)	BLV/BIV-infected (n = 30)	Reference values
HGB, g/L	110.51 ± 5.52	92.21 ± 4.37*	96.71 ± 4.82*	83.01 ± 4.17*	90–120
HCT, %	42.53 ± 4.31	35.36 ± 3.72*	38.86 ± 3.95*	31.86 ± 3.12*	35–45
ESR, mm/h	5.31 ± 0.51	14.4 ± 1.41*	15.82 ± 1.61*	13.0 ± 1.11*	0–15
RBC, 10 ¹² /L	6.54 ± 0.51	5.35 ± 0.81*	5.83 ± 0.91*	4.85 ± 0.51*	5–7,5
PLT, 10 ⁹ /L	380.66 ± 36.52	635.34 ± 53.51*	698.34 ± 57.51*	571.84 ± 49.51*	260–700
WBC, 10 ⁹ /L	11.50 ± 1.50	19.52 ± 1.76*	25.58 ± 1.93*	23.06 ± 1.56*	4,5–12
Eosinophils, 10 ⁹ /L	0.10 ± 0.01	0.80 ± 0.09*	0.90 ± 0.09*	0.70 ± 0.10*	0–2
Basophils, 10 ⁹ /L	0.10 ± 0.01	1.24 ± 0.41*	1.54 ± 0.31*	1.12 ± 0.21*	0–2
Immature neutrophils, 10 ⁹ /L	0.0 ± 0.0	1.41 ± 0.32*	1.91 ± 0.41*	1.71 ± 0.22*	0–1
Band neutrophils, 10 ⁹ /L	0.40 ± 0.01	1.23 ± 0.41*	2.23 ± 0.47*	1.53 ± 0.35*	2–5
Segmented neutrophils, 10 ⁹ /L	3.71 ± 0.32	5.54 ± 0.62*	6.54 ± 0.52*	7.54 ± 0.42*	5–25
Monocytes, 10 ⁹ /L	2.00 ± 0.30	1.33 ± 0.21*	2.33 ± 0.11*	1.35 ± 0.11*	2–5
Lymphocytes, 10 ⁹ /L	5.27 ± 0.52	8.13 ± 0.89*	10.13 ± 1.12*	9.11 ± 0.99*	5–9

Note: * The difference is statistically significant between the experimental and control groups ($P \leq 0.05$ at t critical 2.10).

3. Сбор лимфоцитов из кольца, образовавшегося между и плазмой и градиентом плотности в отдельную пробирку.

4. Добавление фосфатно-солевого буфера (PBS, Росмедбио РМБ) в объеме 1 мл с последующим трехкратным ресуспендированием и центрифугированием при 1800 об/мин в течение 5 минут 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.

Для спектрального анализа выбирали участки препарата с равномерным монослоем клеток на стекле.

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-кратном увеличении (12×40). Регистрировали величину интенсивности поглощения светового пучка (I_λ в видимой области спектра при спектральной ширине ($\delta\lambda$ 300–700 нм. По полученным данным определяли степень поглощения окрашенных лимфоцитов в спектре эозина Y и азура II.

Статистическая обработка цифровых данных включала определение средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m). Различия контроля и опытных групп считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$.

Результаты (Results)

Результаты исследования общего анализа крови (ОАК) животных представлены в таблице.

Как следует из данных таблицы, у *BLV*- и *BIV*-инфицированных коров содержание гемоглобина, показатели гематокрита и эритроцитов крови находились на нижних пределах референсных значений. У *BLV/BIV*-инфицированных животных эти показатели были снижены на 12 %, 13 % и 3 % соответственно по сравнению с нижней границей нормограммы для данного вида животных, что может свидетельствовать о нарастающей гипоксии организма.

Скорость оседания эритроцитов в группах животных с ретровирусной инфекцией приближалась к верхней границе нормы и была в 2,7; 2,9; 2,4 раза выше для *BLV*, *BIV*, и *BLV/BIV*-инфицированных коров, соответственно, чем у интактных коров. На фоне выраженного лейкоцитоза со сдвигом нейтрофильного ядра влево свидетельствует о наличии инфекционных и воспалительных процессов.

Содержания лейкоцитов в крови *BLV*-, *BIV*-, *BLV/BIV*-инфицированных коров было в 1,7; 2,2; 2,0 раза выше главным образом за счет фракции нейтрофилов – в 1,5; 1,7; 2,0 раза соответственно по сравнению с интактными, что свидетельствует об усилении воспаления и хемотаксиса иммунных клеток.

Количество лимфоцитов крови животных всех групп было в пределах нормы или чуть выше референсных величин, то есть клинические признаки лейкоза у них выявлены не были, хотя количество лимфоцитов крови *BLV*-инфицированных было в 1,5; *BIV*-инфицированных в 1,9; *BLV/BIV*-инфицированных в 1,7 раза больше чем у интактных. Полученные нами данные коррелируют с результатами других исследователей и свидетельствуют об изменении гомеостаза организма инфицированных животных даже при отсутствии клинических признаков заболевания [2, с. 160], [19, с. 74], [20].

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 Y, 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.

Азур II – двухкомпонентный сложный краситель, спектр поглощения которого находится 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 может несколько варьировать. Так область поглощения для эозина Y в биологических объек-

тах начинается уже с 360 нм, а для азура II – с 580 нм [21, с. 56, 117, 158]. Однако основные пики поглощения были зарегистрированы именно в диапазоне указанных длин волн для данных красителей (см. рисунок).

Как следует из данных, проиллюстрированных на рисунке, при исследовании спектров поглощения окрашенных агранулоцитов крови коров с ретровирусной моно- и микст-инфекцией в сравнении с таковыми у интактных животных, были зарегистрированы достоверные отличия в полученных показателях. Для лимфоцитов коров с сочетанной патологией (*BLV/BIV*) значения поглощения (I_{λ} в спектре эозина Y и азура II составили $351,2 \pm 17,6$ и $751,4 \pm 37,6$ counts соответственно. Для животных с *BLV*- и *BIV*-моноинфекцией 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. Исходя из того, что 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 показателю соотношения 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 раза 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 морфо-топографических изменений по сравнению с интактными животными [14].

То есть можно предположить, что в данном случае в клетке развивается метаболический ацидоз. При этом pH может быть приближен к нормальным показателям, и метаболическая активность клеток не снижается. Более того, повышенная метаболическая активность клеток сама по себе является причиной развития ацидоза. 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 про-

межучточных 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.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Таким образом, *BLV-BIV*-микст-инфекция сопровождается более глубокими изменениями гомеостаза организма

животных, нежели моноинфекция, и характеризуется выраженными признаками гипоксии и воспаления. Кроме того, в инфицированных ретровирусами лимфоцитах содержание базофильных веществ в 1,6–2,6 раза 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.

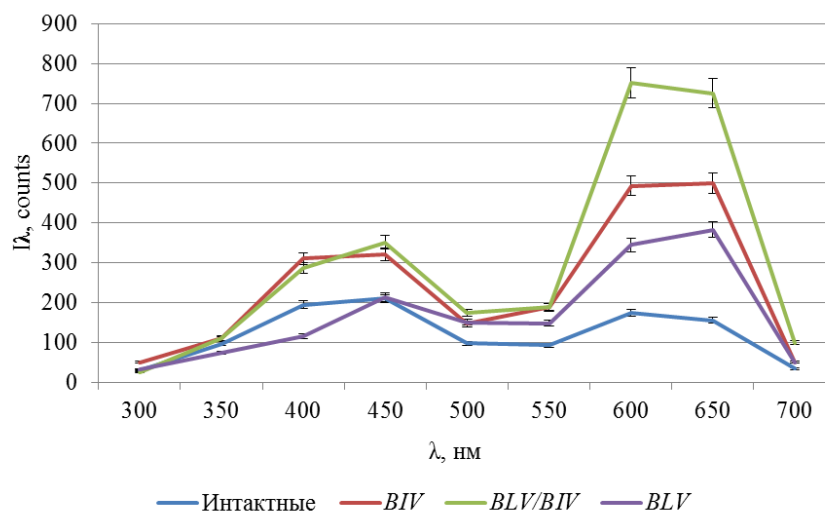


Рис. Зависимость интенсивности поглощения окрашенных лимфоцитов от длины волны

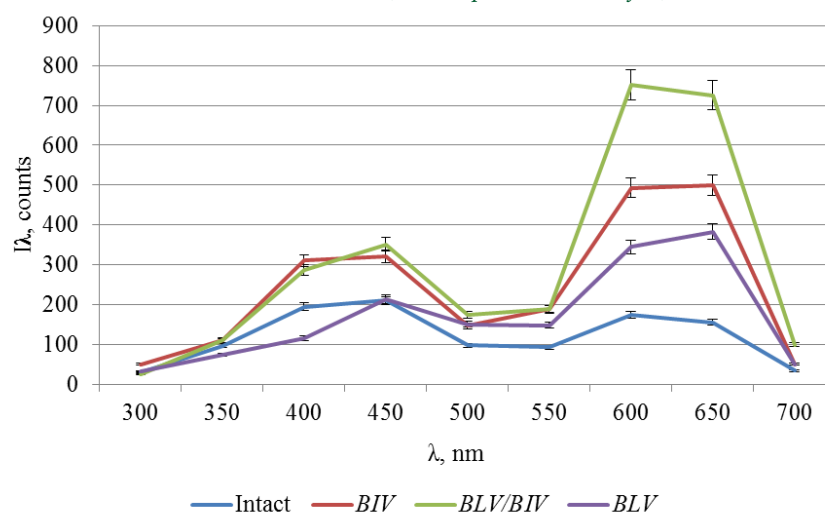


Fig. Dependence of the stained lymphocytes absorption intensity on the wavelength

Библиографический список

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 // Journal of Mammary Gland Biology and 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? // Frontiers in Microbiology. 2017. No. P. 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). P. 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. P. 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.
12. Nieto Farias M. V., Souza F. N., Lendez P. A., Martínez-Cuesta L., Santos K. R., Della Libera A. M. M. P., Ceriani M. C., Dolcini G. L. Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2018. No. 206. Pp. 41–48.
13. Passos-Castilho A. M., Marchand C., Archambault D. B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication // *Virology*. 2018. No. 515. Pp. 158–164.
14. Krasnikova E., Artemev D., Stolbovskaya O., Krasnikov A., Kostishko B., Radionov R. The study of the structural features of the lymphocytes from cattle with and without retroviral infection using atomic force microscopy // *Proceedings Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX*. 2018. Vol. 10716. P. 107160G.
15. Stolbovskaya O., Khayrullin R., Saenko Yu., Krasnikova E., Krasnikov A., Fomin A., Skaptsov A. In vitro metabolism study of normal and tumor cells when exposed to red LED light // *Proceedings Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS)*. Vol. 9917. Pp. 99171Q-1–99171Q-6.
16. Артемьев Д. А., Красников А. В., Козлов С. В., Красникова Е. С., Калганов С. А. Сравнительный анализ функциональной активности лимфоцитов крупного рогатого скота при *BLV*- и *BIV*-инфекции // *Научная жизнь*. 2019. Т. 14. Вып. 5. С. 714–723.
17. Бердюгина О. В., Скорняков С. Н., Медвинский И. Д., Ершова А. В., Павлов В. А., Бердюгин К. А. Функционально-метаболические изменения иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких (обзор литературы) // *Уральский медицинский журнал*. 2013. № 2. С. 121–127.
18. Нагоев Б. С., Камбачокова З. А. Функционально-метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных рецидивирующей герпетической инфекцией // *Журнал инфектологии*. 2011. Т. 3. № 3. С. 38–41.
19. Супотницкий М. В. Неудобная иммунология // *Актуальная инфектология*. 2016. № 2 (11). С. 73–97.
20. Околелов В. И., Божко С. П., Ощепков В. Г. Применение спектрофотометрии для диагностики лейкоза крупного рогатого скота // *Проблемы стабилизации и развития сельскохозяйственного производства Сибири, Монголии и Казахстана в XXI веке. Ч. 2: тезисы докладов международной научно-практической конференции*. Новосибирск, 1999. С. 235–237.
21. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. [Электронный ресурс]. С. 56, 117, 158. URL: <https://chem21.info> (дата обращения: 16.12.2019).

Об авторах:

Александр Владимирович Красников¹, доктор ветеринарных наук, доцент, профессор кафедры «Зоотехния и ветеринария», ORCID 0000-0002-4127-8725, AuthorID 688912; +7 927 224-70-63

Дмитрий Алексеевич Артемьев², аспирант, ассистент кафедры «Болезни животных и ВСЭ», ORCID 0000-0003-3968-9979, AuthorID 793656; +7 937 227-04-72

Екатерина Сергеевна Красникова¹, доктор ветеринарных наук, доцент, профессор кафедры «Зоотехния и ветеринария», ORCID 0000-0003-4395-5862, AuthorID 672926; +7 986 989-31-97, krasnikovaes77@yandex.ru

Сергей Васильевич Козлов², доктор ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры «Болезни животных и ВСЭ», ORCID 0000-0003-2164-8140, AuthorID 671237; +7 917 214-19-38

¹ Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия

² Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов, Россия

Application of a multispectral assay for evaluation of the morphofunctional status of immunocompetent cells in cattle with retroviral diseases

A. V. Krasnikov¹, D. A. Artemiev², E. S. Krasnikova^{1✉}, S. V. Kozlov²

¹ Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia

² Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, Saratov, Russia

✉ E-mail: krasnikovaes77@yandex.ru

Abstract. Microspectral analysis is a highly informative way to study the morphofunctional status of cells, including immunocompetent ones. **Purpose** of the study was an application it for studding of bovine lymphocytes in cattle with enzootic leukemia and viral immunodeficiency, which is important for diagnostics and differential diagnostics of diseases, as well as for analyzing of animal homeostasis and making a prognosis of the disease. Leukemia and immunodeficiency are classified as hematopathological processes. Therefore, we used the hematological method as a comparative **method**. Spectral analysis of stained with a Leukodif 200 kit agranulocytes was carried out using the universal color analyzer microscope-spectrophotometer LOMO MSFU-K. The value of the light absorption intensity was measured in the visible-light spectrum from 300 to 700 nm. The **results** of microspectral analysis showed that for cows' lymphocytes with combined pathology (*BLV/BIV*), the absorption values in the spectrum of eosin U and azure II were 351.2 ± 17.6 and 751.4 ± 37.6 counts, respectively. For animals with *BLV* and *BIV* mono-infection, these indicators were 253.3 ± 12.7 ; 383.3 ± 19.2 and 371.5 ± 18.5 ; 500.2 ± 24.9 counts. While in intact cows, these indicators were registered at the level of 210.3 ± 10.5 and 173.6 ± 8.6 counts. In intact animals, the acidic and basic components ratio in the cell was uniformly proportional, the ratio coefficient was 0.83 ± 0.04 . For *BIV*-, *BLV*- and *BLV/BIV*-infected animals, this coefficient was 1.34 ± 0.06 , 1.51 ± 0.08 and 2.13 ± 0.11 , that was in 1.6, 1.8 and 2.6 times higher than in intact animals, which might be an indicator of metabolic acidosis in the cell. The scientific novelty of the research is that the signs of hypoxia and inflammation detected by hematological analysis correlate with the results of microspectral analysis and indicate a change in the homeostasis of the infected animal's organism, including at the cell level.

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

For citation: Krasnikov A. V., Artemiev D. A., Krasnikova E. S., Kozlov S. V. Ispol'zovanie mikrospektral'nogo analiza dlya otsenki morfofunktsional'nogo statusa immunokompetentnykh kletok pri retrovirusnykh zabolevaniyakh krupnogo rogatogo skota [Application of a multispectral assay for evaluation of the morphofunctional status of immunocompetent cells in cattle with retroviral diseases] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 06 (197). Pp. 58–65. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-197-6-58-65. (In Russian.)

Paper submitted: 24.12.2019.

References

1. Donnik I. M. Opredeleniye dinamiki rasprostranennosti leykoza krupnogo rogatogo skota na territorii Rossiyskoy Federatsii [Determination of the prevalence dynamics of bovine leukemia in the Russian Federation] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2013. No. 01 (107). Pp. 25–27. (In Russian.)
2. Krasnikova E. S., Agol'tsov V. A., Kudinov A. V. Gemato-biokhimicheskiy status korov pri BLV- i BIV-infektsii [Hemato-biochemical status of cows with *BLV* and *BIV* infection] // Scientific Life. 2016. No. 2. Pp. 159–167. (In Russian.)
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 // Journal of Mammary Gland Biology and 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? // Frontiers in Microbiology. 2017. No. P. 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). P. 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. P. 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.

12. Nieto Farias M. V., Souza F. N., Lendez P. A., Martínez-Cuesta L., Santos K. R., Della Libera A. M. M. P., Ceriani M. C., Dolcini G. L. Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2018. No. 206. Pp. 41–48.

13. Passos-Castilho A. M., Marchand C., Archambault D. B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication // *Virology*. 2018. No. 515. Pp. 158–164.

14. Krasnikova E., Artemev D., Stolbovskaya O., Krasnikov A., Kostishko B., Radionov R. The study of the structural features of the lymphocytes from cattle with and without retroviral infection using atomic force microscopy // *Proceedings Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX*. 2018. Vol. 10716. P. 107160G.

15. Stolbovskaya O., Khayrullin R., Saenko Yu., Krasnikova E., Krasnikov A., Fomin A., Skaptsov A. In vitro metabolism study of normal and tumor cells when exposed to red LED light // *Proceedings Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS)*. Vol. 9917. Pp. 99171Q-1–99171Q-6.

16. Artem'yev D. A., Krasnikov A. V., Kozlov S. V., Krasnikova E. S., Kalganov S. A. Sravnitel'nyy analiz funktsional'noy aktivnosti limfotsitov krupnogo rogatogo skota pri BLV- i BIV-infektsii [Comparative analysis of lymphocytes functional activity in cattle with *BLV* and *BIV* infection] // *Scientific Life*. 2019. T. 14. Vol. 5. Pp. 714–723. (In Russian.)

17. Berdyugina O. V., Skorniyakov S. N., Medvinskiy I. D., Yershova A. V., Pavlov V. A., Berdyugin K. A. Funktsional'no-metabolicheskiye izmeneniya immunokompetentnykh kletok pri tuberkuleze legkikh (obzor literatury) [Functional and metabolic changes of immunocompetent cells at tuberculosis of lungs (Literature review)] // *Ural Medical Journal*. 2013. No. 2. Pp. 121–127. (In Russian.)

18. Nagoyev B. S., Kambachokova Z. A. Funktsional'no-metabolicheskaya aktivnost' neytrofil'nykh granulotsitov u bol'nykh retsdiviruyushchey gerpeticheskoy infektsiyey [Functional-metabolic activity of neutrophils granulocytes at patients the herpetic infection] // *Journal Infectology*. 2011. T. 3. No.3. Pp. 38-41. (In Russian.)

19. Supotnitskiy M. V. Neugodnaya immunologiya [Unwanted immunology] // *Actual infectology*. 2016. No. 2 (11). Pp. 73–97. (In Russian.)

20. Okolelov V. I., Bozhko S. P., Oshchepkov V. G. Primeneniye spektrofotometrii dlya diagnostiki leykoza krupnogo rogatogo skota // *Problemy stabilizatsii i razvitiya sel'skokhozyaystvennogo proizvodstva Sibiri, Mongolii i Kazakhstana v KHKHI veke*. Ch. 2: tezisy dokladov mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Novosibirsk, 1999. Pp. 235–237. (In Russian.)

21. Spravochnik khimika 21. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya [Chemist handbook 21. Chemistry and chemical technology] [e-resource]. URL: <https://chem21.info>. (appeal date: 16.12.2019). (In Russian.)

Authors' information:

Aleksandr V. Krasnikov¹, doctor of veterinary sciences, associate professor, professor of the department of animal science and veterinary medicine, ORCID 0000-0002-4127-8725, AuthorID 688912; +7 927 224-70-63

Dmitriy A. Artemiev², postgraduate, assistant of the department of animal diseases and veterinary-sanitary expertise, ORCID 0000-0003-3968-9979, AuthorID 793656; +7 937 227-04-72

Ekaterina S. Krasnikova¹, doctor of veterinary sciences, associate professor, professor of the department of animal science and veterinary medicine, ORCID 0000-0003-4395-5862, AuthorID 672926; +7 986 989-31-97, krasnikovaes77@yandex.ru

Sergey V. Kozlov², doctor of veterinary sciences, associate professor, associate professor of the department of animal diseases and veterinary-sanitary expertise, ORCID 0000-0003-2164-81406 AuthorID 671237; +7 917 214-19-38

¹ Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia

² Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, Saratov, Russia