

На правах рукописи



РУСАКОВА ЯНИНА ЛЕОНИДОВНА

**ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ВИРУСНОМ ЛЕЙКОЗЕ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Новосибирск 2021

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

Научный руководитель:

Магер Сергей Николаевич

доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Власенко Василий Сергеевич

доктор биологических наук, доцент,
ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»,
главный научный сотрудник

Красников Александр Владимирович

доктор ветеринарных наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Мичуринский государственный
аграрный университет», заведующий
кафедрой зоотехнии и ветеринарии

Ведущая организация:

**ФГБНУ «Уральский федеральный
аграрный научно-исследовательский
центр УрО РАН», Уральский научно-
исследовательский ветеринарный
институт**

Защита диссертации состоится 24 декабря 2021 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.002.02, созданного на базе ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет» по адресу: 656049, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98, тел/факс 8(385) 20-33-69.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Алтайский ГАУ» и на сайте <http://asau.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Фёдорова Галина Анатольевна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время изучение различных способов воздействия (иммунная, клеточная, генная терапия, применение препаратов различного происхождения) на лейкоз животных, вызванных ретровирусами, особенно актуально. Интерес к экспериментальной модели ретровирусных заболеваний с целью изучения механизмов вирусного канцерогенеза, а также для разработки и применения препаратов различного происхождения для лечения и профилактики нашел свое отражение в многочисленных исследованиях российских и зарубежных авторов. Значительное число научных работ, связанных с экспериментальным лейкозом Раушера, направлено на исследование таких ретровирусных заболеваний как HIV-1, HIV-2 (Allen, L. B., 1995; Gallicchio, V.S., 1992). Не смотря на то, что в семействе ретровирусов вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV), вирус лейкоза кошек (FeLV) и мышинные лейкозы относятся к разным родам, в многочисленных работах исследователей отмечается сходство происходящих иммунопатологических процессов, а некоторые авторы указывают на их прямое филогенетическое сходство (Генджиева, О. Б., 2012).

Используются и развиваются наработки и идеи российских и зарубежных авторов относительно применения пробиотиков в улучшении статуса больных вирусными иммунодефицитами и гемобластозами (людей и животных) (Чердынцева, Н. В., 1999; Happel, A. U., 2018 и др.). Биологические и экологические свойства штамма Субалина® были всесторонне изучены авторами-разработчиками препарата и другими исследователями (Белявская, В. А., 2001; Литвяков, Н. В., 2001). При работе над диссертацией были изучены коллективные труды и отдельные монографии ученых, посвященные изучению безвредности и биомедицинского потенциала рекомбинантного пробиотического штамма *B.subtilis* (Смирнов, В. В., 1993; Чудновская, Н. В., 1995 и др.).

Многочисленные публикации демонстрируют большой диапазон мнений при освещении отдельных аспектов клеточной терапии лейкозов: эффекта воздействия клеток-предшественников. В медицине трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) костного мозга и/или периферической крови у детей до 15 лет рассматривается как основной метод лечения апластических анемий, наследственных заболеваний крови, иммунной системы и обмена веществ (Позднякова, О. О., 1997; Румянцев, А. Г., 2003). В работах Iwai H. (1994) показано, что в эксперименте пересадка костного мозга от резистентных линий мышей (доноров) ингибирует вирусную инфекцию в восприимчивых мышах и задерживает их гибель.

Степень разработанности темы. В доступных нам работах ученых в недостаточной степени исследованы проблемы, связанные с динамикой гематологических, иммунологических и морфофункциональных изменений, происходящих в ответ на введение субалина и мезенхимальных стволовых клеток на модели ретровирусного лейкоза. Недостаточно хорошо освещен вопрос возможности использования мышей BALB/c, инфицированных вирусом лейкоза Раушера, как модели для исследования ретровирусной инфекции у животных. Мы полагаем, что на основании полученных данных мы сможем оценить биомедицинский потенциал препарата субалин и мезенхимальных стволовых клеток в борьбе с ретровирусным лейкозом.

Цель исследования. Оценить влияние пробиотика субалина и мезенхимальных стволовых клеток на иммунный статус мышей с экспериментальным лейкозом Раушера.

Задачи исследования. 1. Изучить динамику гематологических, иммунологических показателей и морфофункциональных изменений лимфоидных органов у мышей BALB/c при длительном течении экспериментального вирусного лейкоза.

2. Изучить влияние пробиотика субалин на морфологические показатели крови и морфофункциональные изменения органов периферической иммунной системы у интактных и инфицированных вирусом лейкоза Раушера мышей.

3. Изучить воздействие мезенхимальных стволовых клеток на показатели крови, а также на морфофункциональные изменения лимфатических узлов и селезенки при развитии вирусного лейкоза Раушера у мышей BALB/c.

Научная новизна. Выявлены закономерности гематологических изменений в гиперпластическом и терминальном периоде длительно протекающего вирусного лейкоза (нарастающая эритропения и лейкопения, появление юных клеток в раннем периоде; нейтропения, увеличение дегенеративного сдвига, лимфоцитопения, эозинофилия и моноцитоз в терминальном периоде); изучены морфофункциональные изменения лимфоузлов и селезенки; исследована пролиферативная активность спленоцитов у инфицированных мышей.

Впервые исследована терапевтическая эффективность при парентеральном применении препарата субалин в условиях ретровирусного лейкоза Раушера (RLV), включающая оценку морфофункциональных изменений органов периферической иммунной системы. Выявлено повышение спонтанной, Con A и PWM пролиферативной активности спленоцитов, выравнивание гематологических показателей и лейкопоза, усиление лимфоцитпродуцирующей функции лимфатических узлов.

Впервые проанализирован иммуномодулирующий потенциал мезенхимальных стволовых клеток, оценена возможность их применения у животных (на модели мышей BALB/c) в условиях вирусного лейкоза. На основании морфофункциональных исследований лимфоидных органов выявлено отсутствие выраженного иммуностимулирующего действия мезенхимальных стволовых клеток в условиях вирусного лейкоза Раушера, при этом показан явный сдерживающий эффект развития заболевания, что подтверждается достоверными различиями в гиперпластическом и терминальном периоде массы селезенки инфицированных мышей, получавших и не получавших клеточный препарат.

Показано иммуностимулирующее действие стволовых клеток на интактных животных, что проявлялось активизацией герминативных центров селезенки, увеличением Т-зависимых зон лимфоидных органов и количества клеток плазматического ряда, усилением пролиферации спленоцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые научные знания по гематологическим, иммунологическим и морфофункциональным изменениям, происходящим в лимфоидных органах у мышей BALB/c при длительном течении экспериментального вирусного лейкоза Раушера.

Результаты, полученные при изучении влияния иммуномодулирующих препаратов субалин и мезенхимальных стволовых клеток на иммунную систему мышей BALB/c при экспериментальном вирусном лейкозе Раушера, могут служить морфологической основой для дальнейших теоретических и клинических исследований функционального состояния иммунной системы и корректировки иммунодефицитных состояний при ретровирусных инфекциях животных.

Результаты, полученные на экспериментальной модели, могут быть использованы для определения направлений научных исследований по патогенезу развития ретровирусных инфекций, при которых основной мишенью является иммунная система животных.

Разработаны рекомендации «Применение препарата Субалин для повышения иммунного статуса телят в хозяйствах неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота», внедрены в производственную деятельность ЗАО «Озёрское», ОАО «Решетовское» и ООО «Ярковское» Новосибирской области.

Методология и методы исследования. Объект исследования. Для исследования в качестве экспериментальных животных были выбраны инбредные мыши BALB/c, самки с исходной массой тела 18-22г. Животных приобретали в питомнике НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского Национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

Все исследования проводились согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» и стандартным операционным процедурам лаборатории. Условия содержания соответствовали правилам, принятым Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986г.). Животные содержались в поликарбонатных клетках на подстилке из древесной стружки, получали стандартный гранулированный корм и профильтрованную водопроводную воду.

Для проведения исследования использовали 120 инбредных мышей. Биоматериал, полученный от животных, подвергался комплексному иммунологическому, гематологическому, морфологическому исследованию. Наблюдение за животными продолжалось до их естественной гибели и составило 11 месяцев. Оценка клинического состояния животных проводилась ежедневно, пальпация 2 раза в неделю. Контрольные точки исследования общего клинического анализа крови, морфофункциональных изменений лимфоузлов и селезенки были обозначены в гиперпластический (2 месяца после заражения) и терминальный (8-11 месяцев после заражения) периоды.

Было сформировано 6 экспериментальных групп. В каждой группе по 20 животных. Группа Антиген (АГ) – животные, инфицированные вирусом лейкоза Раушера. Группа Субалин (Суб) – каждому животному вводили препарат субалин в количестве 1,5 дозы, что составляет $1,5 \times 10^9$ КОЕ. Группа Антиген + Субалин (АГ + Суб) – совместно с вирусом лейкоза Раушера каждому животному вводили препарат Субалин в той же дозе. Группа Стволовые клетки (СК) – каждому животному вводили стволовые клетки в количестве 750 тыс клеток на животное. Группа Антиген + Стволовые клетки (АГ + СК) – каждому животному вводили одновременно вирус лейкоза Раушера и стволовые клетки.

Группа интактные животные (К). Группа интактных животных являлась контрольной. Животным вводили физиологический раствор в количестве 0,5 мл.

Методика заражения мышей вирусом лейкоза Раушера. Для заражения мышей вирусом лейкоза Раушера использовали методику «НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга», г. Томск. У них же брали исходный материал (инфицированных мышей). Титр вируса считали по доле селезенки зараженной мыши. Так селезенку массой 200 мг суспендировали с 200 мкл физиологического раствора, центрифугировали при 1000 об/мин 5 мин, собирали надосадок, доводили до начального объема 200 мкл, разводили в 100 мл физиологического раствора. Для заражения 1 животного брали 0,1 мл (1/1000 часть селезенки), инъекцию выполняли внутрибрюшинно.

Препарат субалин (пробиотик на основе *Bacillus subtilis* из рекомбинантного штамма бактерий, задепонированного в Российской коллекции промышленных микроорганизмов за номером В 4759 и изготовленный в соответствии с утвержденными техническими условиями) – разработка ФБУН «Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор», доза препарата $1,5 \times 10^9$ живых микробных клеток (определена в предварительных опытах).

Методика получения стволовых клеток. Выделение мезенхимальных стволовых клеток проводили в лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ НМИЦ им. ак. Е.Н.Мешалкина МЗРФ. Для получения стволовых клеток получали костный мозг перфузией физиологического раствора с гепарином (из расчета 5 единиц гепарина на 1 мл раствора) через диафиз бедренной кости. Объем перфузии составлял 40 мл. Выделение моноклеарной фракции производили в условиях стерильного бокса IIа класса защиты, при соответствующей экипировке персонала (стерильные перчатки, хирургические костюмы, маски, шапочки, стерильные халаты, бахилы) по стандартной методике. Полученный аспират костного мозга центрифугировали на градиенте плотности фиколл-урографин 1,077 г/л, собирали полученную фракцию моноклеарных клеток, среди которых находились мезенхимальные стволовые клетки. Чистоту клеток подтверждали с помощью проточной цитометрии (проточный цитометр Navios Berckman Coulter). Клетки несли маркеры CD²⁹, CD⁴⁴, CD⁷³, CD⁹⁰, CD¹⁰⁵, CD¹⁰⁶ и были негативны по маркерам CD³⁴, CD⁴⁵, HLA-DR. Концентрировали клетки в 0,1 мл физиологического раствора, доводя концентрацию до $7,5 \times 10^6$ клеток/мл. Жизнеспособность суспензии клеток, после окрашивания 5% раствором трипанового синего, составляла 95-98%. Перемещали клеточную суспензию в шприцы и вводили внутрибрюшинно.

Гематологические исследования. Кровь набирали в микропипетки, стабилизировали гепарином. Гематологические исследования включали определение количества эритроцитов, лейкоцитов (по стандартной методике в счетной камере Горяева), подсчет лейкоцитарной формулы проводили на окрашенных мазках крови по стандартным методикам (Лабораторные методы исследования в клинике: справочник; под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.).

Методика оценки пролиферативной активности спленоцитов у мышей. Исследование пролиферативной активности спленоцитов у мышей выполняли под руководством к.м.н. Колесниковой О. П. на базе лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Для оценки функциональной активности лимфоидных клеток *in vitro* при тестировании спонтанной и Т- и В-митоген-индуцированной пролиферации спленоцитов забирали селезенки мышей в стерильных условиях и готовили клеточную суспензию. Полученную клеточную суспензию доводили до концентрации $0,7 \times 10^6$ клеток/мл полной среды и помещали в 96-луночные круглодонные планшеты для культивирования по 100×10^3 клеток/лунку в объеме 150 мкл/лунку. Добавляли оптимальные дозы митогенов Con A, PWM, определённые в предварительных опытах: 2 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно, – в объеме 10 мкл. Для оценки спонтанной пролиферации в лунки добавляли 10 мкл среды RPMI-1640. Все пробы проводились в триплетах. Инкубацию клеточной культуры проводили при $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , в течение 72 часов. Пролиферативную активность клеток оценивали по включению H^3 -тимидина в ДНК делящихся клеток. Метку вносили за 16 час до конца культивирования по 1 мкКи в каждую лунку планшета. Для этого основной раствор H^3 -тимидина сначала растворяли в среде RPMI-1640 до концентрации 100 мкКи/мл, а затем по 10 мкл раствора добавляли в каждую лунку планшета. По окончании инкубации клетки собирали на стекляннно-волоконистые фильтры (Flow Lab) с помощью аппарата «Harvester» (TITERTEK). Фильтры помещали во флаконы для сцинтилляционного счёта и радиоактивность подсчитывали в сцинтилляторе (4 г дифенилоксасола и 0,1 г дифенил-оксазолбензола на 1 л толуола) в жидкостном сцинтилляционном счётике «Delta» (США). Результаты оценивали в имп/мин. на 100×10^3 клеток, подсчитывали средние значения по триплету. Оценка данных проводилась в абсолютных значениях.

Морфометрия и световая микроскопия. Для гистологического исследования забирали селезенку и медиальные подвздошные лимфатические узлы после естественной гибели или после декапитации животных под эфирным наркозом. По стандартной гистологической методике выполняли проводку материала, заливали объекты исследования в парафиновые блоки, с которых делали срезы толщиной 5-7 мкм. Образцы окрашивали гематоксилином-эозином и по Майеру и азур-эозином по Нохт-Максимову (Ромейс, Б., 1954; Волкова, С. В., 1971). Окрашенные срезы заключали в полистирол. Препараты маркировали в соответствии с группой эксперимента, видом ткани и датой забора материала. Морфометрию проводили методом точечного счёта с помощью стандартной сетки (256 точек), вмонтированной в окуляр микроскопа МБС-10. Определяли объемную плотность структур медиальных подвздошных лимфоузлов и селезенки, подсчитывали клеточные элементы в них. В селезенке определялись площади белой и красной пульпы и площади их отдельных структур: герминативных центров, маргинальной зоны, периартериальной муфты, тяжей и синусов красной пульпы. В лимфатических узлах определяли площадь первичных, вторичных лимфоидных узелков, коркового плато, паракортикальной зоны, мозговых тяжей, мозговых синусов.

Выделение структурных компонентов и дифференцировку клеточных форм производили с учетом Международной гистологической номенклатуры (Афанасьева, Ю. И., 1989). Клетки лимфоидных органов распознавали, используя имеющиеся рекомендации (Малофеев, Ю. М., 2000; Раковщик, А. Л., 2002).

Статистическую обработку полученных данных проводили методом подсчета средних арифметических (M), стандартных ошибок (m). В таблицах информация представлена в виде $M \pm m$. Уровень значимости различий вариационных рядов оценивали параметрическим t -критерием Стьюдента.

Положения, выносимые на защиту. 1. Вирус лейкоза Раушера может вызывать длительное течение заболевания с прогрессирующей иммуносупрессией, которая подтверждается изменениями гематологических, иммунологических показателей и морфофункциональной перестройкой лимфоидных органов у мышей BALB/c .

2. Иммуномодулирующее действие препарата субалин у интактных мышей и мышей, инфицированных вирусом лейкоза Раушера, подтверждается морфофункциональной перестройкой лимфоидных органов и крови животных.

3. Мезенхимальные стволовые клетки сдерживают развитие вирусного лейкоза у мышей, при этом оказывают различное иммуномодулирующее действие в организме интактных и инфицированных вирусом лейкоза Раушера мышей, что отражается в изменениях морфологических и иммунологических показателей животных.

Степень достоверности и апробация результатов: достоверность результатов, полученных в диссертационном исследовании, обоснована применением актуальной научно-методической базы, использованием современных методов исследования и сертифицированного оборудования. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на IX Сибирской ветеринарной конференции (Новосибирск, 2009г); международной научно-практической конференции «Кормопроизводство, продуктивность, долголетие и благополучие животных» (Новосибирск, 2018г), на XIV международной научно-практической конференции «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» памяти академика Ю. И. Бородина (Новосибирск, 2021 г.).

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 9 из них – статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, 3-х глав (включающих обзор литературы, описания материалов и методов исследования, собственных исследований), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка иллюстративного материала и приложения. Материал изложен на 193 страницах машинописного текста, включающего 26 таблиц и 20 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 182 литературных источников, в том числе, 120 иностранных авторов.

1. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Динамика изменений гематологических, иммунологических, и морфологических показателей при экспериментальном лейкозе Раушера у мышей BALB/c

В целях расширения и уточнения научного представления о сущности механизмов вирусного лейкоза изучена динамика гематологических, иммунологических и морфофункциональных показателей периферической иммунной системы мышей BALB/c при хроническом вирусном лейкозе Раушера. В крови выявлены нарастающая эритропения и лейкопения в раннем гиперпластическом периоде заболевания (Таблица 1). В ответ на введение мышам RLV в гиперпластическом периоде болезни появились юные клетки, увеличилось количество нейтрофилов в 2 раза (по сравнению с контролем). В терминальном периоде, количество юных клеток уменьшалось до 0,78%. При этом мы отмечали нейтропению, лимфоцитопению, эозинофилию и моноцитоз.

Таблица 1 – Динамика гематологических показателей животных опытных групп Антиген (АГ), Субалин (Суб), Антиген + Субалин (АГ + Суб), Стволовые клетки (СК), Антиген + Стволовые клетки (АГ + СК) и Контрольной группы (К), ($M \pm m$)

Группа животных	Эритроциты гиперпластический период	Эритроциты терминальный период	Лейкоциты гиперпластический период	Лейкоциты терминальный период
АГ	$5,39 \times 10^6 \pm 0,43^*$	$3,73 \times 10^6 \pm 0,15^*$	$4,19 \times 10^3 \pm 0,68^*$	$5,12 \times 10^3 \pm 0,74$
Суб	$10,26 \times 10^6 \pm 0,94$	$9,5 \times 10^6 \pm 0,23$	$8,82 \times 10^3 \pm 1,29$	$10,51 \times 10^3 \pm 1,32$
АГ + Суб	$6,56 \times 10^6 \pm 1,17^*$	$6,09 \times 10^6 \pm 0,76^* \Delta \bullet$	$5,21 \times 10^3 \pm 0,68$	$8,18 \times 10^3 \pm 1,99$
СК	$9,7 \times 10^6 \pm 0,9$	$11,67 \times 10^6 \pm 0,25^*$	$7,58 \times 10^3 \pm 0,95$	$10,64 \times 10^3 \pm 1,49$
АГ + СК	$3,55 \times 10^6 \pm 0,94^*$	$6,33 \times 10^6 \pm 0,71^* \Delta$	$5,83 \times 10^3 \pm 1,06$	$14,83 \times 10^3 \pm 1,92^* \Delta$
Контроль	$10,03 \times 10^6 \pm 0,4$	$9,29 \times 10^6 \pm 0,35$	$8,17 \times 10^3 \pm 1,2$	$7,78 \times 10^3 \pm 0,94$

Здесь и далее □разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными контрольной группы; Δ разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными опытной группы (АГ); ● разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными опытной группы (Суб); ♥разница достоверна (при $P \leq 0,05$) в сравнении с данными опытной группы (СК)

Изучение морфофункциональных изменений лимфоидных органов показало, что под воздействием RLV в гиперпластическом периоде болезни снизилась транспортная функция медиального подвздошного лимфоузла, усилилась пролиферативная активность лимфоидных клеток, активировались обменные процессы в клетках В-зоны. В терминальной стадии у животных произошло угнетение иммунного ответа, при этом лимфопоэтическая активность оставалась высокой (Таблица 2).

Таблица 2 – Морфофункциональные изменения лимфатических узлов мышей BALB/c при экспериментальном лейкозе Раушера ($M \pm m\%$)

Показатели	АГ гиперпластический период	АГ терминальный период	Контроль гиперпластический период	Контроль терминальный период
С мозговых синусов	21,35 ± 0,42*	26,81 ± 1,3*	23,83 ± 0,67	16,5 ± 0,42
Вторичные лимфоидные узелки	1,94 ± 0,19*	0,52 ± 0,08*	6,21 ± 0,11	3,86 ± 0,23
Митозы в мозговых тяжах	1,8 ± 0,11*	2,39 ± 0,31*	0,61 ± 0,1	1,38 ± 0,09
Незрелые плазмциты в мозговых синусах	14,96 ± 0,58*	17,5 ± 0,65*	8,84 ± 0,45	12,53 ± 0,62
Лимфобласты герминативных центров	10,14 ± 0,34*	9,6 ± 0,53*	3,77 ± 0,17	6,82 ± 0,16
Митозы герминативных центров	2,81 ± 0,17*	4,9 ± 0,31*	1,06 ± 0,07	2,24 ± 0,16
Нейтрофилы герминативных центров	0,68 ± 0,08*	0,74 ± 0,08*	0,21 ± 0,05	0,36 ± 0,07

Изменения селезенки инфицированных животных характеризовались увеличением ее в гиперпластический период в 5,3 раза, а в терминальный период в 21,9 раз по сравнению с контрольными животными (Таблица 3).

Исследуя площади структурно-функциональных зон селезенки мышей опытных групп, мы пришли к выводу, что у животных, инфицированных RLV, увеличилась площадь синусов красной пульпы за счет скопления эритроцитов в селезенке, причем в гиперпластический период в большей степени, чем в терминальный. При этом площадь белой пульпы уменьшилась, отражая происходящую иммуносупрессию у инфицированных животных (Таблица 3).

Снижение спонтанной и митоген-стимулированной пролиферативной активности спленоцитов позволяет сделать вывод об угнетении Т- и В-иммунного ответа мышей, инфицированных вирусом лейкоза Раушера.

В клеточном составе селезенки отмечалось увеличение количества средних лимфоцитов во всех зонах белой пульпы в гиперпластический период RLV, а также увеличение плазмобластов, эритробластов, плазмцитов и мегакариоцитов в красной пульпе (Таблица 3).

Таблица 3 – Морфофункциональные изменения селезенки мышей BALB/c при RLV (M±m%)

Показатели	АГ гиперпластический период	АГ терминальный период	Контроль гиперпластический период	Контроль терминальный период
Масса селезенки, мг	708±37,51*	2944,78±574,71*	134,33±5,05	134,44±1,76
Синусы красной пульпы	68,7 ± 1,34*	59,2 ± 0,52*	45,03 ± 0,37	29,96 ± 0,64
S герминативного центра	3,3 ± 0,18*	12,1 ± 0,45*	6,93 ± 0,2	5,56 ± 0,25
Лимфобласты в герминативном центре	3,93 ± 0,23*	-	1,65 ± 0,12	1,06 ± 0,11
Незрелые плазмоциты тяжелой красной пульпы	20,93 ± 1,15*	14,0 ± 1,25	10,0 ± 0,63	11,0 ± 0,35
Незрелые плазмоциты синусов красной пульпы	8,95 ± 0,52*	14,13 ± 1,07*	5,04 ± 0,18	1,92 ± 0,16
Эритробласты периартериальной муфты	-	13,35 ± 0,54	-	-
Эритробласты тяжелой красной пульпы	2,1 ± 0,17*	13,96 ± 0,54*	0,53 ± 0,16	0,14 ± 0,05
Эритробласты синусов красной пульпы	2,72 ± 0,3*	17,81 ± 1,0*	0,5 ± 0,1	0,25 ± 0,07
Спонтанная пролиферация спленоцитов (имп/мин)	1067 ± 135,7*	914 ± 88,92	8072 ± 270,1	1515 ± 399,9
ConA пролиферация спленоцитов (имп/мин)	1934 ± 106,6*	21223 ± 1001,1*	30603 ± 1312,4	53618 ± 1018,4
Белая пульпа, %	19,47	30	41	45

Переход болезни в терминальную стадию характеризовался невозможностью идентификации клеток герминативного центра и маргинальной зоны, появлением эритробластов в зоне периартериальной муфты и большой перегруженностью эритробластами красной пульпы.

Обнаруженные в исследовании закономерности морфофункциональных и иммунологических изменений крови и лимфоидных органов в гиперпластическом и в терминальном периоде вирусного лейкоза Раушера отличаются от аналогичных результатов тем, что получены на хронической модели заболевания, длившееся 11 месяцев (в то время как абсолютное большинство исследований описывает гибель животных в течение 1,5-2 месяцев), что позволяет использовать и дальше эту модель для изучения хронических ретровирусных заболеваний, в первую очередь вирусного лейкоза крупного рогатого скота и других животных.

Изменение иммунологических, гематологических показателей на введение препарата субалин при экспериментальном лейкозе Раушера у мышей BALB/c

Введение животным субалина не повлияло на динамику гематологических показателей у интактных мышей. В то же время субалин оказал значительное влияние на выравнивание гематологических показателей и лейкопоз животных инфицированных вирусом лейкоза Раушера (Таблица 1). В группе АГ + Суб изменения крови мышей сходны с группой АГ, но менее выражены, при этом значительно увеличилось количество юных клеток в лейкограмме (в 4 раза больше, чем в группе АГ) в терминальном периоде.

В ответ на введение субалина в гиперпластическом периоде в медиальном подвздошном лимфоузле у мышей произошло увеличение краевого синуса в 2 раза по сравнению с контролем (Таблица 4).

Таблица 4 – Морфофункциональные изменения лимфатических узлов мышей BALB/c опытной группы АГ, Суб и АГ + Суб в гиперпластический (I) и терминальный (II) период развития болезни в сравнении с контрольной группой ($M \pm m$)%

Показатель	АГ	Суб	АГ+Суб	Контроль
Корковое вещество (I)	33,3 ± 2,32	40,15 ± 1,01*	33,5 ± 1,55●	33,57 ± 1,37
Корковое вещество (II)	23,32 ± 1,56*	33,74 ± 1,93*	26,98 ± 1,73*●	49,56 ± 2,33
Первичные лимфоидные узелки (I)	1,15 ± 0,07*	1,34 ± 0,17	1,52 ± 0,1Δ	1,83 ± 0,15
Первичные лимфоидные узелки (II)	0,41 ± 0,06*	1,88 ± 0,08	0,96 ± 0,06*Δ●	2,29 ± 0,18
Вторичные лимфоидные узелки (I)	1,94 ± 0,19*	5,62 ± 0,16*	3,27 ± 0,2*Δ●	6,21 ± 0,11
Вторичные лимфоидные узелки (II)	0,52 ± 0,08*	2,67 ± 0,13*	2,58 ± 0,15*Δ	3,86 ± 0,23
Паракортикальная зона (I)	29,3 ± 1,15*	31,27 ± 0,59*	27,32 ± 1,1●	23,71 ± 1,1
Паракортикальная зона (II)	21,76 ± 0,92*	27,14 ± 0,96*	22,45 ± 0,62*●	40,1 ± 1,63
Краевой синус (I)	0,89 ± 0,07	1,4 ± 0,08*	1,09 ± 0,08*	0,65 ± 0,1
Краевой синус (II)	0,11 ± 0,02*	1,1 ± 0,03*	0,88 ± 0,1*Δ	0,54 ± 0,05
Герминативный центр (I)	0,81 ± 0,07*	2,5 ± 0,09	1,2 ± 0,08*Δ●	2,86 ± 0,11
Герминативный центр (II)	0,15 ± 0,03*	0,87 ± 0,06	0,72 ± 0,06*Δ	1,04 ± 0,07
Мозговые тяжи (I)	43,15 ± 1,21	33,37 ± 0,72*	35,6 ± 0,56*Δ	40,1 ± 0,37
Мозговые тяжи (II)	48,72 ± 1,44*	44,18 ± 1,36*	40,22 ± 1,25*Δ	31,79 ± 1,08

Это свидетельствует об усилении транспортной функции лимфатического узла. Также выявилось увеличение коркового вещества на 6,58% при сохранении фрагментированного типа строения данного лимфатического узла (корково-мозговой индекс 0,7) и увеличение паракортикальной зоны (на 7,56% по сравнению с контролем). Основные изменения клеточного состава лимфоузла группы Субалин в гиперпластическом периоде выражались в увеличении в 2 раза митотически делящихся клеток в мозговых тяжах и в увеличении клеток плазматического ряда в мозговых синусах (по сравнению с контролем). В терминальном периоде наблюдения у мышей группы Субалин уменьшилась площадь коркового вещества медиального подвздошного лимфоузла, его первичных и вторичных лимфоидных узелков, коркового плато и паракортикальной зоны. Площадь мозгового вещества, капсулы и краевого синуса напротив, увеличилась (по сравнению с контролем). В клеточном составе мозговой зоны лимфоузла увеличилось количество зрелых и незрелых клеток плазматического ряда. Таким образом, мы пришли к выводу, что введение субалина животным приводит в гиперпластическом периоде к усилению Т-клеточного иммунитета (увеличение паракортикальной зоны) и стимуляции В-клеточного иммунитета (увеличение митозов в мозговых тяжах и плазмочитов в мозговой зоне).

Анализируя изменения цитоархитектоники лимфатических узлов, происходящих в ответ на совместное введение RLV и субалина (группа АГ + Суб), мы отмечали в гиперпластический период заболевания уменьшение площади герминативных центров и мозговых тяжей (Таблица 4); увеличение количества лимфобластов и митозов (более чем в 2 раза по сравнению с контро-

лем) в герминативных центрах и количества незрелых плазмочитов в мозговых синусах. При этом большинство показателей клеточного состава лимфоузла были близки к контрольным значениям (в отличие от группы АГ), что позволяет предположить о положительном влиянии препарата субалин на стабилизацию лимфоидной системы организма животных, инфицированных вирусом лейкоза Раушера. В период терминального развития заболевания в группе АГ + Суб морфологическая перестройка лимфатических узлов, по нашему мнению, отражала активные иммунные процессы на введение антигена. Это характеризовалось увеличением количества лимфобластов, митозов и зрелых антителобразующих клеток.

Исследования селезенки показали, что в гиперпластическом периоде гиперплазия селезенки опытных групп Суб и АГ + Суб была практически одинаковой и отличалась от группы контроля в 3,38раз (Таблица 5).

При гистологическом исследовании селезенки животных группы Субалин мы отмечали типичное строение органа. Умеренное диффузное кровенаполнение красной пульпы, увеличение герминативных центров лимфатических фолликулов, увеличения в них количества бластных клеток, митозов. Встречались большие бластные клетки, имеющие многоядерные ядра и обильную бледную цитоплазму (реактивная гиперплазия). В группе АГ + Суб отмечали стирание границ красной и белой пульпы, уменьшение относительной площади белой пульпы селезенки, тонкую мантийную зону.

При изучении морфофункциональных изменений селезенки при введении субалина здоровым животным была выявлена стимуляция В-клеточного иммунного звена (увеличилась площадь герминативных центров, увеличилось количество лимфобластов, средних лимфоцитов, митотически делящихся клеток) в гиперпластический период наблюдения. Высокий уровень пролиферации спленоцитов (как с митогеном так и без него) так же характеризует стимуляцию иммунного ответа. В терминальном периоде наблюдения результаты исследования свидетельствуют об усиленном гуморальном иммунном ответе у мышей, которым вводили субалин: увеличение количества незрелых клеток плазматического ряда в мозговых тяжах. А так же об усиленном эритропоэзе (возрастание количества мегакариоцитов, эритробластов и клеток на стадии митоза) (Таблица 5).

При совместном воздействии антигена и субалина на животных мы выявили следующие изменения в селезенке. В гиперпластическом периоде заболевания уменьшилась площадь белой пульпы как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой Субалин. Но все-таки оставалась выше, чем в группе Антиген. Из чего мы предполагаем, что Субалин стимулирует иммунный ответ в условиях развития вирусного лейкоза. Так же признаками активации иммунного ответа мы считаем увеличение количества лимфобластов, митотически делящихся клеток, плазмобластов и плазмочитов в белой пульпе селезенки и в синусах красной пульпы. В терминальной стадии вирусного лейкоза мы отмечали значительное увеличение количества ретикулярных клеток во всех зонах селезенки мышей группы АГ + Суб. Так же увеличилось количество митозов и эритробластов в красной пульпе. Однако количество эритробластов в группе АГ + Суб остается намного ниже, чем в группе АГ.

В целом изменения селезенки в группе АГ + Субалин имели сходство как с группой АГ так и с группой Субалин. Уровень спонтанной пролиферации спленоцитов в терминальном периоде не отличался от контрольных значений, а стимулированная пролиферация спленоцитов оставалась низкой у животных, которым вводили АГ + Субалин.

Таблица 5 – Морфофункциональные изменения селезенки мышей BALB/c опытных групп АГ, Суб, АГ + Суб, СК, АГ + СК и Контрольной группы в гиперпластический (I) и терминальный (II) период, (M ± m), %

Показатель	период	АГ	Суб	АГ + Суб	СК	АГ + СК	Контроль
Масса селезенки, мг	(I)	708 ± 37,51*	454,29 ± 89,4*	440,25 ± 82,49*Δ	161,67±10,82	143,33±12,03Δ	134,33 ± 5,05
	(II)	2944,78 ± 574,71	592,2 ± 3,41*	541,5 ± 67,79*Δ	157,11±9,69	593,22±48,56*Δ♥	134,44 ± 1,76
Центральная артерия	(I)	0,4 ± 0,05*	0,42 ± 0,05*	0,61± 0,04*●Δ	1,49 ± 0,06*	0,34 ± 0,04*♥	0,86 ± 0,06
	(II)	0,2 ± ,03*	0,55 ± 0,05Δ	0,74 ± 0,07Δ*	1,09 ± 0,07*	0,98 ± 0,07*Δ	0,48 ± 0,02
Периартериальная муфта	(I)	1,05 ± 0,05*	1,22 ± 0,09*	1,71 ± 0,11●Δ	2,83 ± 0,08*	1,33 ± 0,05*Δ♥	1,88 ± 0,04
	(II)	1,33 ± 0,04	2,08 ± 0,08*	1,94 ± 0,09*Δ	3,19 ± 0,13*	1,7 ± 0,06 *Δ♥	1,38 ± 0,09
Герминативный центр	(I)	3,3 ± 0,18*	9,14 ± 0,2*	6,69 ± 0,29●Δ	7,64 ± 0,14*	10,56 ± 0,36*Δ♥	6,93 ± 0,2
	(II)	12,1 ± 0,45*	7,17 ± 0,52*	8,12 ± 0,25*Δ	6,5 ± 0,2*	8,24 ± 0,32*Δ♥	5,56 ± 0,25
Лимфобласты герминативного центра	(I)	3,93 ± 0,23*	3,70 ± 0,11*	3,52 ± 0,32*	2,47 ± 0,15*	3,66 ± 0,28*	1,65 ± 0,12
	(II)	-	3,11 ± 0,2*	2,02 ± 0,22●	1,55 ± 0,09	3,07 ± 0,32♥*	1,6 ± 0,11
Плазмобласты красной пульпы	(I)	2,45±0,26	5,12±0,11*	3,54 ± 0,21●*Δ	4,11 ± 0,21*	3,7 ± 0,25*Δ	1,67 ± 0,13
	(II)	1,88±0,16*	3,06±0,21*	2,19 ± 0,31*	1,92 ± 0,17*	2,41 ± 0,22*	1,19 ± 0,1
Спонтанная пролиферация спленоцитов (имп/мин)	(I)	1067±135,7*	15321,5 ± 336,3*	1534 ± 160,0*●	10638 ± 422,3*	1970 ± 35,4*Δ♥	8072 ± 270,1
	(II)	9147 ± 88,92*	2272 ± 100,2	2014 ± 203,3Δ	1999,8 ± 292,7	5155 ± 137,8*Δ♥	1515 ± 399,9
ConA пролиферация спленоцитов (имп/мин)	(I)	1934±106,6*	146894,3±1965,4*	7924±904,4*●Δ	50692 ± 1065,2*	1145 ± 191,1*Δ♥	30603±1312,4
	(II)	21223±1001,1*	123857,6±1783,2*	25640±1417,5●*	48974 ± 291,4*	3411 ± 196,2*Δ♥	53618±1018,4

Возможность применения стволовых клеток для стимуляции иммунной системы мышей BALB/c при экспериментальном лейкозе Раушера

У мышей, которым вводили мезенхимальные стволовые клетки, в гиперпластическом периоде отмечали достоверно значимый эритроцитоз (Таблица 1), увеличение количества эозинофилов, палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов. В терминальном периоде количество эозинофилов снижалось до контрольных значений, а лимфоцитов уменьшилось в 1,6 раз; уровень палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов оставался повышенным.

При введении мезенхимальных стволовых клеток совместно с вирусом лейкоза Раушера, в лейкограмме крови этой опытной группы животных отмечали увеличение количества палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов (активация фагоцитоза), однако при этом наблюдали угнетение лимфоцитарного ростка, характеризующееся лимфоцитопенией на протяжении всего периода наблюдения.

Исследуя морфофункциональные изменения медиальных подвздошных лимфатических узлов животных, которым вводили СК, мы пришли к выводу, что в ответ на введение мононуклеарных мезенхимальных стволовых клеток в гиперпластическом периоде наблюдалось увеличение Т-зависимой паракортикальной зоны (развитие клеточного иммунитета) и уменьшение В-зависимой зоны (подавление гуморального ответа), а также активизация герминативных центров. Это выражалось в увеличении количества в них лимфобластов и митотически делящихся клеток (Таблица 6).

Таблица 6 – Морфофункциональные изменения лимфатических узлов мышей BALB/c опытной группы Стволовые клетки и Антиген + Стволовые клетки в сравнении с группой Антиген и Контроль в гиперпластический (I) и терминальный (II) период болезни, (M±m)%

Показатель	АГ	СК	АГ + СК	Контроль
Корковое вещество (I)	33,3 ± 2,32	36,86 ± 2,46	30,28 ± 1,03	33,57 ± 1,37
Корковое вещество (II)	23,32 ± 1,56*Δ	50,7 ± 3,7	22,42 ± 1,18*♥	49,56 ± 2,33
Паракортикальная зона (I)	29,3 ± 1,15*	30,71 ± 0,63*	24,1 ± 0,98Δ♥	23,71 ± 1,1
Паракортикальная зона (II)	21,76 ± 0,92*Δ	45,23 ± 1,78	17,9 ± 1,1*♥	40,1 ± 1,63
Вторичные лимф. узелки (I)	1,94 ± 0,19*	3,49 ± 0,28*	2,13 ± 0,08*♥	6,21 ± 0,11
Вторичные лимф. узелки (II)	0,52 ± 0,08*Δ	1,85 ± 0,18**	1,55 ± 0,19*Δ	3,86 ± 0,23
В-зона (I)	47,15 ± 2,3	43,52 ± 2,1	45,24 ± 1,52	49,93 ± 1,95
В-зона (II)	50,28 ± 2,75	37,42 ± 3,5	48,72 ± 1,41♥	41,28 ± 2,51
Лимфобласты герминативного центра (I)	10,14 ± 0,34*	14,03 ± 1,0*	9,17 ± 0,41*♥	3,77 ± 0,17
Лимфобласты герминативного центра (II)	9,6 ± 0,53*	6,56 ± 0,24	7,43 ± 0,35Δ	6,82 ± 0,16
Митозы герминативного центра (I)	2,81 ± 0,17*	3,63 ± 0,25*	1,91 ± 0,08*Δ♥	1,06 ± 0,07
Митозы герминативного центра (II)	4,9 ± 0,31*Δ	2,13 ± 0,13	2,59 ± 0,31Δ	2,24 ± 0,16

В терминальный период исследования изменения величин как в площади структурно-функциональных зон исследуемого лимфатического узла, так и в клеточном составе этих зон были незначительные. Из чего мы заключили, что в отдаленном периоде наблюдения при введении мезенхимальных стволовых клеток структура лимфатического узла животных стабилизируется и становится близкой к контрольной группе животных.

В группе Антиген + Стволовые клетки мы отмечали снижение лимфодетоксикационной функции подвздошного лимфатического узла и некоторое угнетение гуморального звена иммунитета. Что отражалось в уменьшении площади коркового вещества, вторичных лимфоидных узелков и герминативных центров, а также в уменьшении количества зрелых плазмобластов практически во всех зонах данного лимфатического узла по сравнению с контрольными животными. Данные изменения происходили в гиперпластический период развития болезни. В терминальный период наблюдения в группе АГ + СК мы наблюдали уменьшение площади коркового вещества, коркового плато, вторичных лимфоидных узелков. В клеточном составе отмечали увеличение количества средних лимфоцитов во всех зонах лимфатического узла и макрофагов, а также уменьшение количества зрелых плазмоцитов в мозговом веществе. Количество незрелых плазмоцитов при этом увеличилось. Мы предположили, что увеличение незрелых плазмоцитов и плазмобластов произошло усиленной выработкой их под действием антигена. Уменьшение количества малых лимфоцитов, увеличение количества средних лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов могло быть связано с возрастными изменениями организма.

Особый интерес вызвали изменения, происходящие в селезенке. Мы считаем, что введение стволовых клеток одновременно с вирусом лейкоза Раушера сдерживает развитие эритробластиоза. Это предположение основано на изменении массы селезенки опытных животных. Так масса селезенки в гиперпластический период наблюдения в группе АГ + СК не имела достоверных отличий от контрольной группы, а в терминальный период развития заболевания масса селезенки группы АГ + СК в 4,41 раза больше контрольной и в 5 раз меньше, чем у животных, которым вводили один АГ. Морфологические изменения селезенки у животных этой группы в гиперпластический период, свидетельствуют о стимуляции клеточного и гуморального иммунитета: увеличение Т-зависимых зон (центральная артерия, периартериальная муфта), и герминативного центра (и лимфобластов в нем), а также увеличение количества зрелых и незрелых клеток плазматического ряда в красной пульпе селезенки. В терминальный период эта разница стала еще более значимой, увеличилось количество ретикулярных клеток во всех зонах селезенки (Таблицаб).

Сравнивая как менялись площади структурно-функциональных зон селезенки и ее клеточный состав в группе Антиген + Стволовые клетки, мы пришли к выводу, что при совместном действии антигена со стволовыми клетками увеличение герминативного центра и мантия в раннем периоде более значительное, чем в группе стволовые клетки. Т.е. совместное введение антигена со стволовыми клетками активировало развитие иммунного ответа в большей степени, с усиленной выработкой лимфобластов, плазмобластов, эритробластов. В терминальном периоде в группе АГ + СК площадь герминативного центра, центральной артерии, периартериальной муфты оставались больше, чем в контрольной группе и чем в группе антигена. Оставалось повышенное количество ретикулярных клеток во всех структурно-функциональных зонах селезенки. Количество эритробластов было повышено, но оставалось ниже, чем в группе Антигена. Повышенным оставалось количество лимфобластов и незрелых плазмоцитов.

Изучение спонтанной и митоген стимулированной пролиферации спленоцитов опытных групп показало, что при введении стволовых клеток увеличивается уровень спонтанной и Con A стимулированной пролиферации спленоцитов. При этом PWM пролиферация не имеет достоверных отличий от контрольной группы. ConA стимулированная пролиферация остается повышенной и в отдаленном периоде наблюдения. В группе Антиген + Стволовые клетки спонтанная и митоген стимулированная пролиферация спленоцитов в начальном периоде снижается, приближается по значениям к группе Антигена. В терминальном периоде спонтанная пролиферация возрастает. ConA стимулированная пролиферация снижается.

Применение биологически активных препаратов в борьбе с лейкозом крупного рогатого скота

Проведенное нами исследование *in vivo* показало положительное влияние субалина и мезенхимальных стволовых клеток на иммунологический статус животных, инфицированных ретровирусным лейкозом. Выявленный факт позволяет предполагать модулирующий характер воздействия субалина и мезенхимальных стволовых клеток на клеточное и гуморальное звено иммунной системы в условиях вирусного лейкоза. Мы предполагаем, что следующим этапом исследования может стать изучение данных биологически активных препаратов в условиях BLV. Оно представляется нам особенно перспективным, если использовать крупный рогатый скот в качестве модели *in vivo* для вирусной инфекции HTLV-1 (Т-лимфотропный вирус человека (англ. Human T-lymphotropic virus, HTLV)) у людей. Это могло бы помочь как пониманию возможно общих механизмов канцерогенеза, вызванного дельтаретровирусом, так и развитию новых стратегий борьбы с BLV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. У инфицированных вирусом лейкоза Раушера мышей установлена нарастающая эритропения и лейкопения, при этом наблюдали более выраженное достоверное угнетение лимфоцитарного роста в гиперпластическом периоде заболевания и снижение спонтанной и митогенстимулированной пролиферации спленоцитов.
2. Переход RLV в терминальную стадию у животных сопровождается потерей дифференциации клеток селезенки в герминативных центрах и маргинальной зоне, появлением эритробластов в зоне периартериальной муфты и перегруженностью ими красной пульпы.
3. Показатели общего клинического анализа крови у контрольных животных и животных, которым вводили препарат субалин, не имеют достоверных отличий; при этом морфофункциональные изменения лимфоидных органов последних показывают стимуляцию В- и Т-клеточного иммунитета.
4. Установлено, что введение препарата Субалин инфицированным вирусом лейкоза Раушера мышам не оказывало значительного влияния на их летальность, но в то же время стимулировало гемопоэз, что характеризовалось достоверным увеличением количества юных клеток в крови, а также активировало В-звено иммунной системы в терминальной стадии развития заболевания.
5. Введение мезенхимальных стволовых клеток интактным и инфицированным вирусом лейкоза Раушера мышам активизирует фагоцитоз, достоверно увеличивая в крови животных количество палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов.
6. Под действием мезенхимальных стволовых клеток в гиперпластическом периоде у интактных животных активизируются герминативные центры селезенки, достоверно увеличивается Т-зависимая зона лимфоидных органов, достоверно возрастает количество клеток плазматического ряда, усиливается пролиферация спленоцитов. В терминальном периоде эта тенденция прослеживается не всегда.
7. Введение мезенхимальных стволовых клеток инфицированным вирусом лейкоза Раушера мышам способствует поддержанию функциональных возможностей лимфоидных клеток в терминальную стадию заболевания, что проявлялось близким к контрольным значениям количеством первичных лимфоидных узелков в подвздошном лимфатическом узле в сравнении с показателями инфицированных животных терминальной стадии болезни, у которых этот показатель достоверно уменьшился.

На основании полученных результатов следует рекомендовать следующие практические предложения:

1. Результаты, полученные при изучении влияния иммуномодулирующего препарата субалин и мезенхимальных стволовых клеток на иммунную систему мышей BALB/c при экспериментальном вирусном лейкозе Раушера, могут служить морфологической основой для дальнейших теоретических и клинических исследований функционального состояния иммунной системы и корректировки иммунодефицитных состояний при ретровирусных инфекциях животных.
2. Рекомендации «Применение препарата Субалин для повышения иммунного статуса телят в хозяйствах неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота».

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации.

1. Магер, С. Н. Лейкоз Раушера мышей, как экспериментальная модель для отработки методов и средств лечения лейкоза крупного рогатого скота (краткий аналитический обзор)/ С. Н. Магер, Я. Л. Русакова, В. В. Храмцов// Актуальные вопросы ветеринарной медицины. Материалы IX Сибирской ветеринарной конференции 19-20 февраля 2009г.: НГАУ, Новосибирск, 2009. – С.90-92.
2. Русакова, Я. Л. Влияние стволовых клеток на иммунный ответ у мышей BALB/c, зараженных вирусом лейкоза Раушера и переносимость препаратов субалин и сильверол/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов// Вестник НГАУ. – 2012. – №2 (23). – Ч.2. – С.75-79.
3. Русакова, Я. Л. Влияние вируса лейкоза Раушера на гематологические показатели и морфологию лимфатических узлов экспериментальных мышей линии BALB/c/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов// Вестник НГАУ. – 2014. – №3 (32). – С.104-109.
4. Русакова, Я. Л. Морфофункциональные изменения селезенки мышей BALB/c при хроническом течении вируса лейкоза Раушера/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов// Вестник НГАУ. – 2015. – №4 (37). – С.135-141.
5. Русакова, Я. Л. Влияние препарата «субалин» на морфологию лимфоузлов мышей BALB/c, инфицированных вирусом лейкоза Раушера/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов// Сибирский вестник с/х науки. – 2015. – №3. – С.76-82.
6. Русакова, Я. Л. Воздействие препарата «субалин» на гематологические показатели мышей BALB/c, инфицированных вирусом лейкоза Раушера/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов// Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В. Р. Филиппова. – 2015. – №3(40). – С.57-62.
7. Русакова, Я. Л. Морфологические изменения периферической крови у мышей BALB/c при развитии экспериментального лейкоза Раушера и одновременном действии препарата «субалин»/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов// Инновации и продовольственная безопасность. – 2015. – №1(7). – С.43-50.
8. Русакова, Я. Л. Воздействие препарата «субалин» на морфологию лимфатических узлов и гематологические показатели мышей BALB/c, инфицированных вирусом лейкоза Раушера/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов// Вестник НГАУ. – 2015. – №3(36). – С.90-98.
9. Русакова, Я. Л., Магер С. Н. Морфологические изменения в лимфоидных органах у мышей BALB/c в ответ на одномоментное введение вируса лейкоза Раушера и мезенхимальных стволовых клеток// Кормопроизводство, продуктивность, долголетие и благополучие животных. Материалы международной научно-практической конференции, Новосибирск, 25 октября-23 ноября 2018г: Новосибирск, 2018. – С.246-249.
10. Русакова, Я. Л. Биомедицинский потенциал спорового рекомбинантного штамма *Bacillus Subtilis* 2335/105 в составе субалина® как живой терапевтической системы доставки альфа-интерферона при вирусных лейкозах: оценка влияния на иммунные клетки и органы мышей в эксперименте вирусного лейкоза/ Я. Л. Русакова, О. В. Казаков, В. А. Белявская// Инновации и продовольственная безопасность. – 2019. – № 2(24). – С.85-93.
11. Русакова, Я. Л. Иммунный ответ у животных при экспериментальном лейкозе Раушера с применением мононуклеарных стволовых клеток и Субалина/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов и др.// Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2020. – Т50. – № 6. – С. 60-67.

12. Русакова, Я. Л. Изменения гематологических показателей у мышей, экспериментально зараженных вирусом лейкоза Раушера, при введении им стволовых клеток/ Я. Л. Русакова, С. Н. Магер, В. В. Храмцов и др.//Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям: Материалы XIV международной научно-практической конференции памяти академика Ю.И.Бородина, 26-27 марта 2021 г. – Новосибирск, 2021. – Т.1. – С. 207-210.

13. Двоеглазов, Н. Г. Использование реакции иммунодиффузии и иммуноферментного анализа в диагностике лейкоза крупного рогатого скота/Н. Г. Двоеглазов, Т. А. Агаркова, Н. А. Осипова, С. И. Логинов, С. Н. Магер, Я. Л. Русакова//учебно-методическое пособие. – Новосибирск, 2021. – 37с.