

МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ им. К. И. СКРЯБИНА

На правах рукописи

МАРЧЕНКО Галина Ивановна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ХРОМОСОМ КЛЕТОК СИСТЕМЫ КРОВИ
ЗДОРОВЫХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ
ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
И БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗОМ ОБЕЦ**

16.00.02 — патология, онкология и морфология животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

01. 13512.

МОСКВА 1991

Работа выполнена в Московской ордена Трудового Красного Знамени ветеринарной академии им. К. И. Скрябина.

Научный руководитель — академик ВАСХНИЛ, доктор ветеринарных наук, профессор **Шишков В. П.**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук **Дедух Н. В.**, кандидат биологических наук **Разинкова Г. А.**

Ведущая организация: Московский ордена Трудового Красного Знамени институт прикладной биотехнологии.

Защита состоится « *10.* » *января* . . . 199*2* г. в *14.* час. на заседании специализированного совета Д 120.36.01 по защите диссертации на соискание ученой степени доктора наук в Московской ордена Трудового Красного Знамени ветеринарной академии им. К. И. Скрябина (109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23. Тел. 377-93-83).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке академии.

Автореферат разослан « *10.* » *января*. 1991 г.

Ученый секретарь
специализированного совета

Слесаренко Н. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Большой экономический ущерб животноводству наносят злокачественные заболевания сельскохозяйственных животных, ведущее место среди которых занимают лейкозы.

Лейкозы относятся к заболеваниям опухолевой природы — гемобластозам, основным признаком которых является злокачественное разрастание клеток кроветворной ткани и нарушение их созревания. По выдвинутой академиком ВАСХНИЛ, профессором В.П.Шилковым вирусо-иммуно-генетической теории этиологии, патогенеза и профилактики лейкозов сельскохозяйственных животных, важным звеном в цепи изменений, происходящих в клетке в процессе злокачественной трансформации, является геном.

Экспериментально показано, что числовые и структурные отклонения в кариотипе от нормы являются характерной чертой большинства спонтанных и индуцированных опухолей и лейкозов. Интерес к цитогенетическому изучению злокачественного роста клеток особенно повысился в связи с обнаружением специфического маркера ("филадельфийской хромосомы") при хроническом миелоидном лейкозе человека.

Выявление сходства в развитии и клинико-морфологическом проявлении лейкозов и других гемобластозов у человека и животных вызывает необходимость выведения общих закономерностей, лежащих в основе возникновения опухолевых заболеваний. Изучение природы патологического роста клеток связано с разработкой многих проблем и необходимостью дальнейшего совершенствования экспериментальных работ в онкологии сельскохозяйственных животных.

Установлено, что вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) и ретровирус типа С (HTLV) Т-клеточного лейкоза человека имеют большое сходство: не имеют в своём геноме ни онко- ни лейкогенов. Они вызывают заболевание после длительного латентного периода. Большой вклад в изучение этиологии и патогенеза лейкозов сельскохозяйственных животных внесли опыты по экспериментальному воспроизведению лейкоза крупного рогатого скота на овцах и ягнятах, так как воспроизведение заболевания у этого вида животных осуществляется с большим постоянством и в более короткие сроки, чем у крупного рогатого скота и имеет общепатологическое значение в решении вопроса о потенциальном использо-

вании их как модели для изучения лейкогенеза и вирусного канцерогенеза человека.

Несмотря на расширение экспериментальных работ по исследованию наследственной изменчивости соматических клеток в лейкозном процессе у лабораторных животных, всё же у сельскохозяйственных животных, кариологические исследования гемопоэтических клеток проводились недостаточно, а работы цитогенетического характера при изучении экспериментального лейкоза овец в нашей стране не проводились.

Цель и задачи исследований. Цель работы - изучить изменения в кариотипе клеток системы крови здоровых, инфицированных ВП КРС и больных лейкозом овец.

Для достижения намеченной цели перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Усовершенствовать способ получения метафазных хромосом клеток системы крови и изучить спонтанный уровень хромосомных aberrаций у здоровых овец.

2. Идентифицировать хромосомы в кариотипе инфицированных ВП КРС и больных лейкозом овец с использованием дифференциальной окраски.

3. Изучить изменчивость кариотипа клеток системы крови овец в динамике развития онкорнавирусной инфекции.

4. Изучить уровень структурных aberrаций хромосом в клетках системы крови овец в процессе лейкогенеза.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые проведено цитогенетическое изучение экспериментально индуцированной инфекции у овец.

Впервые вопросы о хромосомной нестабильности у больных экспериментальными лейкозами животных исследованы с применением дифференциального метода окраски хромосом, позволившего на качественно новом уровне изучить не только показатель общей повреждаемости хромосом, но и проанализировать специфичность повреждаемости индивидуальных хромосом в динамике развития онкорнавирусной инфекции.

Разработаны оптимальные условия получения метафазных хромосом клеток крови овец для цитогенетических исследований.

Практическая ценность работы заключается в том, что показана возможность использования овец для выявления цитогенетических изменений в клетках системы крови больных лейкозом животных и как модели для изучения механизма вирусного лейкогенеза.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на:

1. Всесоюзной научно-технической конференции молодых учёных по актуальным вопросам профилактики и лечения болезней сельскохозяйственных животных (май 1985).
2. На отчётных научных конференциях Московской ветеринарной академии им. К.И.Скрябина (февраль, 1985, 1986, 1989).
3. III-м Всесоюзном совещании по проблеме повышения резистентности сельскохозяйственных животных (Кострома, 1988).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 научные статьи.

Объём и структура работы. Диссертационная работа изложена на _____ страницах машинописного текста, иллюстрирована таблицами

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы, включающего 267 источников, в том числе 193 зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы, методы и условия проведения исследований

Проведённые исследования являются самостоятельным разделом комплексной темы, разрабатываемой с целью изучения различных аспектов экспериментально индуцированного лейкоза овец.

Изучение проводили на овцах романовской породы, находящихся в виварии Московской ветеринарной академии им.К.И.Скрябина (МВА) и прекос, содержащихся на базе опорного пункта Украинского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии (Укр.НИИЭВ). Заражение и серологический анализ проводили заводской лабораторией лейкозов и радиоиммунологии, старший научный сотрудник МВА В.А.Крикун и старший научный сотрудник Укр.НИИЭВ Е.А.Андриян, гематологический - старший научный сотрудник МВА

Г.С.Петровский. Патологоанатомический диагноз у исследованных животных устанавливали старший научный сотрудник МВА Г.В.Сноз и старший научный сотрудник Укр.НИИЭВ В.А.Андриян.

Животных заражали культурой лейкоцитов крови и кровью от больных лейкозом коров и овец.

Работа по изучению хромосом клеток системы крови была проведена на клинически здоровых, инфицированных ВИ КРС и больных экспериментальными лейкозами животных. Костный мозг был взят у 15, пробы крови у 38 овец.

2.2. Проведение хромосомного анализа

Цитогенетический анализ проводили каждые 4-8 месяцев от овец и баранов в возрасте от 3 месяцев до 5 лет. У всех изучен кариотип клеток костного мозга и периферической крови, культивированной с (фитогемагглютинином (ФГА), а у лейкозных животных без него, культивированной по С.С.Бирбину (1984). В каждом случае старались анализировать не менее 50 клеток. Всего исследовано 21255 метафазных пластинок. В ходе анализа учитывали числовые аномалии и структурные aberrации хромосом: хроматидные и изохроматидные разрывы, обмены хромосом различного типа. Аномальной считали клетку с наличием дополнительной хромосомы или структурной перестройки в двух или более метафазах, или отсутствие одной и той же хромосомы. Для выявления клинико-морфологических особенностей групп животных с идентичными или сходными хромосомными аномалиями учитывали первичные данные серологического и гематологического исследования крови от животных, отрицательных по гематологии на лейкоз и на наличие антител к и по реакции иммунодиффузии в агаровом геле.

Для исследования препаратов хромосом использовали метод простой окраски красителем Гимза и G-метод дифференциальной окраски по М. Seabright (1971), при анализе дифференциально окрашенных хромосом использовали принципы дифференциально окрашенных хромосом овец по М. Matejka, B.P. Cribiu (1987).

Препараты хромосом тщательно просматривали под микроскопом, фиксировали структурные aberrации, подсчитывали анеу- и полиплоидные метафазы. Метафазные пластинки с хорошим разбросом и оптимальной спирализацией хромосом, предназначенные для изучения, микрофотографировали в иммерсионной системе (объектив пла-

нахромат Е 100x1,30) микроскопа МУ - 2 (Carl Zeiss, Jena) с фотонасадкой "mf". Использовались мелкозернистые плёнки "Микрат - 200", "Микрат - 300". Позитивные отпечатки выполняли предпочтительно на контрастной фотобумаге с конечным увеличением до 3000^x.

Для метафазных наборов, соответствующих нашим критериям, были выполнены систематизированные кариотипы.

Накопленный нами материал цитогенетических исследований был подвергнут математическому анализу. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали методы Г.Ф.Лакина (1980).

2.3. Результаты исследований.

2.3.1. Усовершенствование метода приготовления препаратов хромосом клеток крови овец

Для приготовления препаратов хромосом клеток крови овец, мы использовали модифицированный метод культивирования лимфоцитов крупного рогатого скота (И.Л.Гольдман, 1972; А.Ф.Яковлев, 1976; Л.И.Мутузкин, 1984), состоящий из четырёх этапов: взятие крови, приготовление культуры, культивирование, обработка культуры. Чтобы увеличить количество митозов, для культуры мы брали среду следующего состава: 2 мл среды Игла, 2 мл среды 199, 1 мл крови, 0,1 мл ФГА и через 20 часов после начала культивирования обрабатывали культуральную смесь в течение 15 - 20 мин при температуре от -1° до $+1^{\circ}$.

2.3.2. Анализ кариотипа первой группы животных, здоровых, отрицательных по гематологии и серологии на лейкоз

Настоящая работа по изучению хромосом соматических клеток овец при экспериментальном лейкозе проведена на здоровых, инфицированных ВЛ КРС и больных лейкозом овец.

В первую группу вошли здоровые овцы и бараны, отрицательные по гематологии на лейкоз и на наличие антител к ВЛ и по реакции иммунодиффузии в агаровом геле. Лейкоцитоз 5,0 - 15,0 тыс./мкл. Цитогенетически кровь исследована от 35 животных, костный мозг от 15. Всего проанализированно 5031 метафазных пластинок.

2.3.2.1. Спонтанные числовые аномалии и структурные аберрации хромосом здоровых овец

При анализе числовых аномалий хромосом клеток периферической крови и костного мозга овец учитывали анеу- и полиплоидные метафазные пластинки. Подавляющее большинство клеток имело нормальный диплоидный набор хромосом $2n = 54$. Аутосомы были представлены 3 парами метacentрических хромосом, 23 парами акроцентрических хромосом и парой половых, весьма характерных для этого вида животных. У баранов X - хромосома сходна с таковой у овец, а Y - хромосома субметacentрическая самая мелкая хромосома набора.

Помимо диплоидного набора хромосом нами были обнаружены числовые вариации набора, которые имели место в незначительном проценте и включали клетки с гиподиплоидным набором хромосом, которые в культурах клеток крови составляли $4,81 \pm 0,36$, костного мозга $6,75 \pm 0,65$. Полиплоидные клетки составляли всего $1,84 \pm 0,45$.

Необходимо отметить, что при цитогенетическом исследовании культур клеток крови и костного мозга здоровых овец и баранов, нами не были выявлены клетки с гипердиплоидными наборами хромосом.

Исследуя спонтанный уровень структурных аберраций мы установили, что в основном это были разрывы. В культурах клеток крови разрывы хромосом в околоцентромерном районе составляли $1,18 \pm 0,18$, в костном мозге $1,73 \pm 0,34$. Пробелы в крови составляли $0,93 \pm 0,17$, в костном мозге $0,74 \pm 0,22$, одиночные и парные фрагменты выявляли только в крови $0,82 \pm 0,18$, $0,91 \pm 0,16$, соответственно. При первичном просмотре культур клеток крови и костного мозга здоровых овец и баранов мы заметили большое количество ассоциаций и поэтому решили их фиксировать, так в крови их количество было равно $2,60 \pm 0,27$, в костном мозге $3,81 \pm 0,49$.

Интересно, что разрывы хромосом чаще происходили в эухроматических районах. Это свидетельствует об определенной хрупкости данных районов, также такие явления опасны для клетки, так как именно в эухроматических районах хромосом расположены активно функционирующие гены.

Таблица I

Уровень изменчивости хромосом клеток системы крови овец с экспериментально индуцированным лейкозом

№ группы	Количество лейкоцитов, тыс./мл.	Серовология	Кр.	Число исследованных метафаз	Число клеток, М±m	Число	
						клеток с ассоциацией	клеток с явными хромосомами
				с хромосомами	с ассоциацией	клеток с хромосомами	клеток с ассоциацией
I	5,0 - 15,0	-	кр	3535	6,64±0,42	3,84±0,32	2,60±0,27
		-	к/м	1496	8,82±0,73	2,77±0,4	3,81±0,49
II	15,0-20,0	+	кр	3532	13,9±0,58	7,7±0,44	3,45±0,31
		+	к/м	1500	14,53±0,3	3,67±0,49	5,6±0,59
III	20,0-65,0	+	кр	3504	24,49±0,73	15,41±0,61	4,5±0,35
		+	к/м	1477	17,87±0,1	6,64±0,65	7,5±0,69
IV	65,0-160,0	+	кр	3525	38,75±0,82	18,24±0,65	8,76±0,48
		+	к/м	1490	38,05±1,26	15,23±0,93	9,79±0,77

кр - кровь, к/м - костный мозг

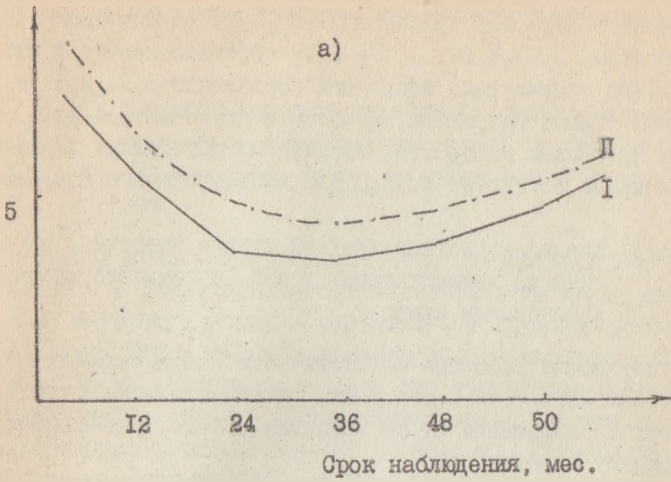
Для проверки зависимости анеуплоидии и структурных aberrаций хромосом от возраста, нами было проведено сравнительное изучение частоты клеток с аномалиями хромосом крови и костного мозга здоровых животных разного возраста. У овец и баранов младшей возрастной группы (3 - 12 мес.) уровень анеуплоидии составлял $7,0 \pm 1,13$, среднего возраста (12 мес. - 4 года) - $3,5 \pm 1,18$, старшей возрастной группы (4 - 5 лет) - $4,7 \pm 0,47$, в костном мозге соответственно $8,11 \pm 0,90$, $4,81 \pm 0,73$, $5,1 \pm 0,49$. В каждую группу входило по 10 животных. Структурные aberrации хромосом составляли у молодых животных в крови $4,7 \pm 0,94$, среднего возраста - $1,8 \pm 0,29$, старшей возрастной группы - $3,14 \pm 0,59$, в костном мозге $2,10 \pm 0,45$, $1,5 \pm 0,38$, $3,22 \pm 0,55$, соответственно. При графическом изображении зависимости анеуплоидии и структурных aberrаций хромосом от возраста, наблюдали повышенный процент у молодых и старшей возрастной группы, в сравнении с овцами и баранами среднего возраста. Кривая имела параболический характер (рис.1).

2.3.3. Анализ кариотипа второй группы животных, инфицированных ВМ КРС, без гематологических изменений

В группу вошли овцы и бараны серологически положительные в РИД, без гематологических изменений. Лейкоцитоз $15,0 - 20,0$ тыс./мкл. Цитогенетически кровь и костный мозг исследованы от 10 животных. Всего проанализировано 5032 метафазных пластинки.

У экспериментальных животных, в первые же месяцы инфицирования, в культурах клеток крови и костного мозга наблюдали числовые аномалии и структурные aberrации хромосом. Анеуплоидия в культурах клеток крови достигала $13,9 \pm 0,58$, большинство составляли гиподиплоидные метафазы $7,07 \pm 0,43$. Наибольшее количество гиподиплоидных клеток было представлено 51-й хромосомой. В клетках костного мозга гиподиплоидия составляла $10,73 \pm 0,6$. У животных второй группы мы уже фиксировали метафазы с гипердиплоидным набором хромосом, так, из всего количества исследованных метафаз культур клеток крови до $4,81 \pm 0,36$ были гипердиплоидными, в то время, как в костном мозге такие клетки отсутствовали. Из гипердиплоидных клеток наибольшее количество составляли с 65-п хромосомами.

Клетки с числовыми аномалиями
хромосом, %



Клетки с структурными
абберациями хромосом, %

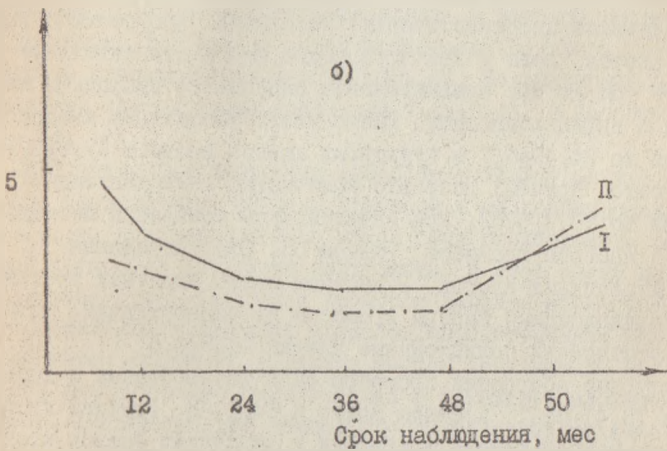


Рис. I Изменения хромосом овец в зависимости от возраста
а - числовые аномалии, б - структурные абберации
I - кровь, II - костный мозг

Структурные aberrации в культурах клеток крови составляли $7,7 \pm 0,44$ и были представлены разрывами хромосом в околоцентромерном районе $3,43 \pm 0,31$, пробелами $2,21 \pm 0,24$, одиночными и парными фрагментами $0,93 \pm 0,16$, $1,13 \pm 0,17$, соответственно. В клетках костного мозга структурные aberrации составляли $3,63 \pm 0,49$ и были представлены только разрывами хромосом в околоцентромерном районе $2,73 \pm 0,42$, пробелами $0,93 \pm 0,24$. Количество ассоциаций в культурах клеток крови достигало $3,45 \pm 0,31$, костного мозга $5,6 \pm 0,59$.

2.3.4. Анализ кариотипа третьей группы животных, серологически положительных в РИД, с гематологическими изменениями крови

В группу вошли животные серологически положительные в РИД, с лейкоцитозом $20,0 - 65,0$ тыс./мкл. Цитогенетически кровь и костный мозг исследованы от 10 животных. Всего проанализировано 5648 метафазных пластинок.

Для инфицированных животных данной группы характерно постепенное увеличение цитогенетических изменений. Хромосомная характеристика клеток крови и костного мозга имела отличительные особенности не только при сравнительном анализе со здоровыми животными, но и с инфицированными. Имело место увеличение анеуплоидных метафаз до $24,49 \pm 0,7$ в культурах клеток крови и $17,8 \pm 0,1$ костного мозга. Причём, возросло количество гипердиплоидных клеток в крови до $10,7 \pm 0,52$, при значительном появлении метафазных пластинок с набором хромосом, равном 55. Они составляли 58% от всех гипердиплоидных клеток. В костном мозге животных третьей группы гипердиплоидные наборы хромосом не обнаруживали, однако в нём присутствовали полиплоидные клетки $5,55 \pm 0,6$.

Структурные aberrации хромосом были разнообразны и достигали в крови $15,41 \pm 0,61$, костном мозге $6,64 \pm 0,65$. Разрывы хромосом в околоцентромерном районе достигали в культурах клеток крови $4,54 \pm 0,35$, костного мозга $4,06 \pm 0,54$. Пробелы, одиночные и парные фрагменты выявляли только в крови $3,71 \pm 0,32$, $2,31 \pm 0,25$, $2,19 \pm 0,25$, соответственно. В клетках крови фиксировали дигентрики и кольца ($1,14 \pm 0,18$, $1,51 \pm 0,21$), отсутствовавшие в клетках костного мозга.

Количество ассоциаций в культуре клеток крови достигало $4,5 \pm 0,35$, костного мозга $7,5 \pm 0,69$.

2.3.5. Анализ кариотипа четвертой группы животных, серологически положительных в РИД, с лейкоэмическими показателями крови при развёрнутой стадии заболевания

В группу вошли овцы серологически положительные в РИД. Лейкоцитоз $65,0 - 160,0$ тыс./мкл. Цитогенетически кровь исследована от восьми животных, у пяти в динамике и у трёх при убое, костный мозг от пяти. Всего проанализировано 5648 метафазных пластинок.

Из 3525 исследованных метафаз культур клеток крови $61,3\%$ были диплоидными. Анализ анеуплоидии показал наличие большого количества гипердиплоидных метафаз $17,08 \pm 0,63$. Группой клеток по численному преимуществу были с 55-м хромосомами, которые составляли $10,3 \pm 0,78$ из всех гипердиплоидных. В костном мозге анеуплоидия достигала $38,05 \pm 1,26$, гипердиплоидные метафазы составили $16,78 \pm 0,96$, гиподиплоидные - $15,17 \pm 0,86$. Полиплоидные метафазы в культурах клеток крови достигали $7,18 \pm 0,43$, в костном мозге $6,11 \pm 0,62$.

Из структурных aberrаций хромосом в культурах клеток крови наиболее частыми были разрывы хромосом в околоцентромерном районе $6,21 \pm 0,41$, из которых основная масса была представлена разрывом третьей хромосомы в области центромеры. В этой связи возникает предположение, что aberrации хромосом характеризующиеся разрывами в определённых сегментах хромосом инфицированных животных и с развившимся лейкозом, являются местом локализации генов, повреждение которых может быть связано с развитием злокачественного процесса. Характерно для данной группы животных наличие в культуре клеток крови кольцевых хромосом $1,95 \pm 0,23$ и дидцентриков $2,04 \pm 0,24$, которые отсутствовали у предыдущих групп животных. Общее количество aberrаций хромосом в культурах клеток крови составляло $18,1 \pm 0,65$.

Структурные aberrации хромосом клеток костного мозга отличались многообразием и достигали $15,23 \pm 0,93$. Представлены были разрывами хромосом в околоцентромерном районе $5,37 \pm 0,58$, проба-

лами $3,09 \pm 0,49$. Кроме того, выявляли одиночные фрагменты $1,41 \pm 0,31$, парные фрагменты $1,54 \pm 0,32$, дицентрики $1,67 \pm 0,33$, кольца $2,15 \pm 0,38$ отсутствовавшие в костном мозге предыдущих групп животных. Фиксировали большое количество ассоциаций, в культуре клеток крови $8,76 \pm 0,48$, костного мозга $9,79 \pm 0,77$.

Цитогенетические исследования культур клеток крови животных с развившимся экспериментальным лейкозом показали, что при экспериментальном заражении овец ВИ КРС могут быть различные типы числовых аномалий и хромосомных aberrаций. У одних овец обнаруживали клетки с анеуплоидией преимущественно гипердиплоидного типа, у других - преобладали полиплоидные клетки. Так, у восьми обследованных животных к настоящему времени убитых или павших от лейкоза, с диагнозом, подтвержденным гистологически, обращает на себя внимание постоянное наличие в культурах клеток крови лейкозных животных клеток с числовыми аномалиями и структурными aberrациями хромосом. У животных № 289, 483, 417, 271, 419 преобладали клетки с гипердиплоидными наборами хромосом, среди них чаще выявляли с 55-ю хромосомами, разрывом хромосомы 3 в околоцентромерном районе, что видимо характерно для лимфоидного лейкоза, так как у этих животных при убое был обнаружен лимфоидный лейкоз. У животных № 424, 290, 251 среди анеуплоидных метафазных пластинок преобладали полиплоидные, из aberrаций хромосом, разрыв хромосомы 3 в околоцентромерном районе.

Приведенные данные изучения культур клеток крови инфицированных ВИ КРС и больных лейкозом животных, являются результатом анализа хромосомных наборов в культурах клеток крови, стимулированных фитогемагглютинином. Без добавления митогена у животных первой, второй и третьей групп митозы не выявляли, но при кратковременном культивировании культур клеток крови животных четвертой группы, с развившимся лейкозом, без добавления ФГА наблюдали митозы. Относительное число клеток с aberrациями хромосом в некоторых случаях было выше, чем в культурах с ФГА, но небольшое количество митозов затрудняло анализ (табл.2). При экспериментальном лимфоидном лейкозе из анеуплоидии преобладали гипердиплоидные клетки, структурные aberrации хромосом, разрыв хромосом в околоцентромерном районе, пробелы, ацентрические

Таблица 2

Исследование хромосом культур клеток крови овец с развившимся лейкозом, после инфицирования ВИ КРС, без добавления ФГА

№ п/п	Показатели крови		Число исследованных метафаз	Клетки, M_{\pm} =		Число клеток с ассоциациями хромосом, M_{\pm} =
	лейкоцитоз, тыс./мкл.	лимфоцитоз, %		с числовыми аномалиями	с структурными аберрациями	
<u>Лимфоцитарный лейкоз</u>						
289	142,0	98	104	40,0 \pm 4,81	15,4 \pm 3,50	9,6 \pm 2,98
483	80,0	98	128	23,2 \pm 3,7	10,3 \pm 2,69	9,38 \pm 2,5
417	160,0	96	185	39,0 \pm 3,59	16,8 \pm 2,75	10,87 \pm 2,28
271	58,0	99	50	43,0 \pm 7,0	15,3 \pm 5,09	8,0 \pm 3,84
419	35,0	95	94	28,4 \pm 4,65	9,0 \pm 2,95	8,51 \pm 2,88
<u>Лимфоаденома</u>						
424	37,0	95	85	35,8 \pm 5,1	13,2 \pm 3,7	10,59 \pm 3,34
290	18,0	98	50	30,0 \pm 6,49	11,6 \pm 3,03	10,0 \pm 4,24
251	38,0	98	38	36,8 \pm 7,8	13,1 \pm 5,47	7,9 \pm 4,38

кие фрагменты. При экспериментальной лимфосаркоме из анеуплоидии преобладали полиплоидные клетки, разрыв хромосом в околоцентромерном районе, дицентрики, кольца. Число клеток с ассоциациями хромосом было велико, у животных № 417, 424, 290 достигало 11%.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствован способ получения метафаз для исследования кариотипа клеток крови овец.

2. В хромосомных наборах культур клеток крови и костного мозга здоровых овец отмечена анеуплоидия с преобладанием гиподиплоидных метафаз и aberrаций хромосом, в основном хроматидного типа.

3. Определена динамика числовой и структурной изменчивости кариотипа клеток системы крови здоровых овец в зависимости от возраста. Установлено, что уровень изменчивости хромосом у животных разных возрастов имеет параболический характер.

4. Впервые прослежены изменения хромосом при развитии инфекции у заражённых ВЛ КРС овец. Установлена прямая коррелятивная зависимость уровня числовых аномалий и структурных aberrаций хромосом от стадии заболевания.

5. Отличительной цитогенетической характеристикой клеток крови и костного мозга овец с развившимся экспериментальным лейкозом было наличие анеуплоидии с преобладанием гипердиплоидных метафаз и aberrаций хромосом, а именно: разрыва третьей хромосомы в околоцентромерном районе, кольцевых хромосом, дицентриков.

6. Показано, что в краткосрочных культурах клеток крови больных лейкозом овец при культивировании без митогена (ФГА) присутствуют митозы с большим количеством aberrаций хромосом, из этого следует, что при более длительном культивировании

часть аномальных клеток не доходит до митоза.

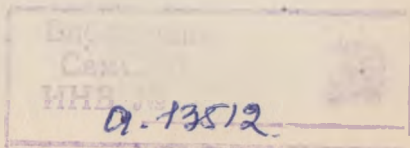
7. Установлено, что гипердиплоидные клетки и структурные aberrации хромосом, выявляемые при лейкозе, появляются в костном мозге в развёрнутой стадии заболевания, что свидетельствует о его вовлечении в злокачественный процесс в последнюю очередь.

8. Цитогенетические изменения могут иметь прогностическое значение при развитии лейкоза. Отмечено, что у овец в первые 3 - 6 месяцев после инфицирования появляются числовые аномалии и структурные aberrации хромосом, характерные для животных больных лейкозом, которые отсутствовали у здоровых.

Сведения о практическом использовании полученных научных результатов.

1. Научные данные кандидатской диссертации внедрены в учебный процесс при чтении лекций студентам ветеринарного факультета, слушателям ФПК, при проведении лабораторно-практических занятий. Утверждено Советом ветеринарного факультета, протокол № 10 от 14 июня 1989 года.

2. По материалам диссертации получено положительное решение о признании изобретения заявки № 4679227 от 27 сентября 1989 года на "Способ получения препаратов хромосом клеток крови животных".



Перечень опубликованных работ

1. Тареева И.Г., Мутузкин Л.И., Марченко Г.И. Возрастная изменчивость карิโอ типа клеток системы крови крупного рогатого скота //Актуальные вопросы этиологии, патогенеза и диагностики неоплазий с.-х. животных: Сб. науч. тр. /Моск. вет. акад. им. К.И. Скрябина.- М., 1984.- С.28-33.

2. Марченко Г.И. Цитологический анализ клеток костного мозга и лейкоцитов крови овец //Актуальные вопросы профилактики и лечения болезней с.-х. животных: Тез. докл. Всес. научно-технич. конф. молодых учёных, Москва, 21-23 мая 1985.- С.34.

3. Марченко Г.И., Стрельченко Н.С. Способ получения препаратов хромосом из крови животных //Проблемы лейкоза и инфекционных заболеваний с.-х. животных: Сб. науч. тр. /Моск. вет. акад. им. К.И. Скрябина.- М., 1988.- С. 57-59.

4. Марченко Г.И. Идентификация хромосом в карิโอ типе овец //Селекция с.-х. жив-х на устойчивость к болезням и повышение резистентности в условиях промышленной биотехнологии: Сб. матер. III Всес. сов. по проблеме повывл. резистентности с.-х. животных.- М., 1988.- С.14-15.

Г.И. Марченко

Объем 1½ п. л.

Заказ 1607.

Типография Московской с.-х. академии им. К. А. Тимирязева
127550, Москва И-550, Тимирязевская ул., 44