подходов, который находит все более широкое применение в вирусологии и биотехнологии.

В лаборатории клеточной биотехнологии была получена гибридная культура клеток A_4xL (почка свиньи ТК$^-$ х лимфоциты лошади), состоящие из популяций эпителиоподобного и лимфоцитоподобного типов клеток. Сроки формирования монослоя 3-4 сутки, индекс пролиферации составил – 7,3-8,1, митотический индекс – 30‰. Модальный класс хромосом клеток гибридной культуры A_4xL составлял 40 на 20 пассаже. Интервал изменчивости хромосом в клетках на 20 пассаже 30-40 хромосом.

Гибридные клетки A_4xL высоко чувствительны к вирусу герпеса лошадей и ринопневмонии лошадей.

После 16 летнего хранения в жидком азоте восстановлена культура клеток A_4xL, заложенная на 10 пассаже. На данный период культура прошла 40 пассажей. Жизнеспособность клеток на 0 пассаже составила 80%. Через 4-5 пассажей восстановлены культурально-морфологические показатели: монослой формировался на 3-4 сутки, коэффициент пересева 1:7-1:8, индекс пролиферации 7,25-8,1.

На цитологических препаратах культура представлена клетками двух типов – эпителиоподобными и лимфоцитоподобными.

Эпителиоподобные клетки полигональной формы, ядра клеток крупные неправильной формы, ядерная мембрана утолщена, количество ядрышек 1-2. Наблюдаются двуядерные клетки. Модальный класс хромосом на 20 пассаже представлен 38 хромосомами, что составляет 51% от общего числа. В процессе стационарного культивирования часть клеток уходит в суспензию и образует конгломераты в питательной среде. Клетки, снятие со стекла и уходящие в суспензию были использованы для получения суспензионных клонов из опорозависимой культуры. Было поставлено 10 опытов с использованием различных питательных сред: ИГЛА МЕМ с 2 наборами аминокислот и витаминов, 199, Игла МЕМ, ДМЕМ и разной концентрации клеток в спинере и роллерных условиях.

В условиях роллерно – суспензионного культивирования, с использованием среды Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов с добавлением сыворотки КРС 15-20%, а также глюкозы(4 г\л) и глютамина (600 мкг\мл), через двое суток наблюдали увеличение концентрации клеток в 5-6 раз. В суспензии живых клеток было 80%. Через трое суток культивирования наблюдали уменьшение живых клеток.

На цитологических препаратах наблюдали сохранение лимфоцитоподобных клеток.

Регуляция эритроцитарного баланса у птиц в условиях острого стресса

Скоркина М.Ю., Липунова Е.А.
Белгородский государственный университет, Белгород

Нормальный эритропоэз предполагает хорошо сбалансированную клеточную систему со сложной регуляцией постоянства количественного и качественного состава отдельных её звеньев [2]. Динамическое равновесие в системе достигается взаимодействием органов продукции и деструкции эритроцитов. Усиление регенерации крови на начальном этапе сопровождается активацией эритродиереза [1, 4]. Напряженность эритропоэза находится в зависимости от продолжительности жизни эритроцита, она варьирует у разных классов животных и связана с интенсивностью метаболизма.

В современных гематологических исследованиях в качестве морфологического критерия активности эритропоэза используется определение содержания ретикулоцитов в периферической крови, одновременно представляется возможность оценить общую функциональную эритропоэтическую деятельность костного мозга. Характеристики костномозговой продукции, количество и функциональные возможности эритроцитов, позволяют прогнозировать развитие адаптационных реакций и оценивать уровень энергообеспечения и стрессоустойчивости птицы. При этом актуально определение не только количеств эритроцитов (и гемоглобина) в единице объема крови, но также их абсолютное содержание в общем объеме крови [5]. Задача проводимого исследования – изучить особенности функциональной перестройки в системе эритрона птиц по данным эритрокинеза в условиях острого стресса.

Опыты проведены на двенадцати петухах кросса “Иза Браун”. В качестве экспериментальной модели острого стресса выбран десинхроноз. Хронофизиологическую нагрузка создавали 3-суточной 12-и часовой инверсией светового режима. Кровь, полученную из подкрыльцовой вены, исследовали до стрессирования и на 1, 3, 7, 15, 23 и 29-е сутки после перевода птиц на естественный ритм суточной периодики. Эритроцитарный баланс и содержание ретикулоцитов в крови определяли усовершенствованным нами способом [6].

В физиологических условиях период полувыведения ретикулоцитов из кровотока составил 2,31±0,17 ч, эритроцитов – 38,9±0,4 сут, продукция эритроцитов – 93,1± 5,0 тыс(мкл/сут) [3]. В первые сутки реабилитационного периода отмечался мощный выброс ретикулоцитов в кровоток, их продукция возрастала на 74,1% ($p<0,01$), а эритроцитов – на 75,5% ($p<0,01$) в сутки. Время созревания ретикулоцитов сокращалось до 1,93+0,25 ч против 2,04±0,15 ч в фоновых опытах и прибавлялось на 22,1% ($p<0,01$) содержание эритроцитов в периферической крови. Максимума костномозговая продукция достигла на 7-е сутки последействия стресса: возрастали по сравнению с фоновыми значениями общее количество эритроцитов (на 25,4%; $p<0,001$), суточная продукция ретикулоцитов и эритроцитов (на 72,3%, $p<0,01$ и 76,0%, $p<0,001$). Через 15 суток адаптационного периода показатели костномозговой продукции стабилизировались и приближались к фоновым. На 23 и 29-е сутки отмечались количественные перестройки в системе эритрона, выразившиеся в понижении синтеза эритроцитов (соответственно на 77,9%, $p<0,001$ и 17,8%, $p<0,001$) и удлинении времени созревания ретикулоцитов. Общее количество эритроцитов в периферической крови понижалось на 17,8% ($p<0,01$) на 23-е и на 18,45 ($p<0,01$) –

29-е сутки; при этом в единичном эритроците происходил прирост концентрации гемоглобина (на 33,0 %, p<0,001, и 45,4%, p<0,001 соответственно).

Изучение процессов регенерации крови как основы компенсаторно-приспособительных механизмов, обеспечивающих сохранение гомеостаза в изменяющихся условиях среды, позволяет выделить следующие особенности реагирования кроветворной ткани птиц на острое стрессирование: в первые 7 суток последействия стресса активируется пластическая функция эритроидного ростка костного мозга (повышаются в периферической крови концентрация эритроцитов, гемоглобина, продукция ретикулоцитов и сокращается время их созревания). На 15-е сутки показатели костномозговой продукции стабилизируются, приближаются к фоновым и далее на 23-29-е сутки реабилитационного периода осуществляется перевод системы в режим «экономии», проявляемом в синтезе меньшего количества, но более насыщенных гемоглобином эритроцитов,

Библиографический список:

1. Горбунова Н.А. Эритродиерез при экстремальных воздействиях и его роль в регенерации крови // Гематология и трансфузиология. – 1985. – № 2. – С. 23-27.

2. Козинец Г.И. Физиологическая (запрограммированная) гибель клеток при гемопоэзе / Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Г.М. Хазем, Ю.К. Новодержкина, О.А. Дягилева, Т.Г. Сарычева, И.М. Федорова // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – № 1. – С. 35-37.

3. Липунова Е.А. Цитокинетические показатели эритроцитарного баланса у птиц в физиологических условиях / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина // Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях/ под ред В.И. Гридневой.– Томск, 2001. – С. 31-33.

4. Ужанский Я.Г. Физиологические механизмы регенерации крови. – М.: Медицина, 1968. – 264 с.

5. Барбашова З.И. Дыхательная функция крови. Руководство по физиологии: Экологическая физиология человека. Ч.2. ,1981. – С. 68-118.

6. Липунова Е.А. Способ определения ретикулоцитов в инкубированной крови птиц/ Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина// заявка № 2002119253 на выдачу патента на изобретение, дата приоритета 16.07.02).

Исследовательская работа выполнена при финансовой поддержке конкурса Минобразования России и администрации Белгородской области 2003 года на соискание грантов на проведение молодыми учеными научных исследований.

Корреляционный анализ в оценке влияния вегетативной дисрегуляции на развитие кардиомиопатии при хроническом эндотоксикозе

Соснин Д.А, Марков Д.Е., Новочадов В.В.
Волгоградский научный центр РАМН, Волгоград

Вегетативная нервная система, регулируя работу сердца, не может не влиять на течение патологических процессов в миокарде. Целью настоящего исследования было, показать влияние вегетативной дисрегуляции на развитие дисметаболического повреждении сердечной мышцы при хроническом эндотоксикозе (ЭТ).

Эксперименты были проведены с использованием 24 белых крыс обоего пола массой 220-270 г. Три опытные группы включали животных с моделированием хронического ЭТ неоднократным введением умеренных доз тетрахлорметана и микробного липополисахарида [Новочадов В.В., Фролов В.И., 2002] на фоне неизмененной вегетативной регуляции, активации симпатического (адреналин) или парасимпатического (пилокарпин) отделов вегетативной нервной системы. В контрольной группе каких-либо манипуляций до выведения из эксперимента не проводилось. Выведение из эксперимента осуществляли передозировкой нембутала спустя 30 суток после начала эксперимента. Морфологическое исследование включало изучение ткани миокарда в окраске гематоксилином и эозином, нервных структур – тионином по Нисслю и серебрением. Морфометрические данные были подвергнуты корреляционному анализу с использованием принципов количественной патологической морфологии [Автандилов Г.Г., 2002] на компьютерном комплексе Видеотест-Морфо 4.0 (Санкт-Петербург, Россия).

Развитие ЭТ во всех опытных группах сопровождалось вторичным повреждением миокарда по типу дисметаболической кардиомиопатии, выраженность которого убывала в ряду: симпатотоники > парасимпатотоники > нормотоники.

В ходе корреляционного анализа была выявлена достоверная отрицательная зависимость между размерами нейронов паравертебральных ганглиев уровней C5-Th2 и толщиной кардиомиоцитов (КМЦ), максимально выраженная в группе с ЭТ на фоне симпатикотонии (r=-0,866). Характерной явилась также положительная корреляция между объемной долей сосудов миокарда и размерами нейронов паравертебральных ганглиев (в пределах 0,664-0.783 в различных группах). Аналогичные корреляции с параметрами нейронов ганглиев уровней Th4-Th8 Th10-L2, а также морфометрии нейронов боковых рогов спинного мозга были выражены в гораздо меньшей степени. Важным моментом явилось выявление отрицательной корреляции между объемной плотностью и размерами ядер нейронов N. dorsalis n. vagi и площадью поперечного сечения КМЦ. Как и следовало ожидать, данные корреляции были максимально выражены у крыс с ЭТ на фоне парасимпатикотонии (в пределах -0,706-0,829). Аналогичные, но менее выраженные связи прослеживались и для объемной плотности ядер КМЦ. Между морфометрическими показателями различных экстра- и интраорганных вегетативных ганглиев сердца и КМЦ выявлены весьма вариабельные корреляции, с преобладанием положительных (и максимальных на фоне применения холиномиметиков), что подтверждает преимущественно парасимпатическое влияние этих ганглиев на миокард. Корреляционный анализ выявил также наличие ряда корреляций между морфометрическими показателями ядер гипоталамуса и КМЦ, причем такое влияние было более выражено у животных с симпатикотонией.