

nas aeruginosa, Klebsiella, Proteus и E. coli.

Результаты исследований показывают, что перечень выявленных возбудителей, инфекционных болезней, значительно расширился, а особую озабоченность вызывает выявление вирусов гриппа А птиц

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты эпизоотологического обследования птицеводческих хозяйств ряда регионов страны в последние 12 лет. Эпизоотологическая ситуация оценивалась по клиническому, патологоанатомическим показателям и лабораторной диагностике с использованием ТФ ИФА, РГА, РЗ-ГА, РДП и биопробы. Установлены причины распространения и проявления некоторых возбудителей. Показано, что перечень возбудителей, выявленных инфекционных болезней, значительно расширился, а особую озабоченность вызывает распространение вируса гриппа птиц, болезни Марека, ПМВ-1 и ПМВ-2, геморрагического энтерита индюшек, клебсиеллеза, сальмонеллеза и др.

RESUME

Study demonstrate the results of epizootological observations in Several regions of Russia and Ukraine during 12 year period. Epizootological situation was estimated at the clinical, pathomorphological and serological (ELISA, GAT, JDT) data. The following agents have been recognized as causes of growing worse of situation: Chicken plague, Marec diseases virus, Paramyxovirus 1and 2, Hemorrhagic enteritis of turkeus, Salmonella, Klebsiella and other infections of poultry.

Литература

1. Бакулов И.А. и др. Эпизоотическая ситуация по болезням диких животных в России и зарубежных странах в 90-х годах 20-го столетия. ВНИИВВиМ. Международная научно-практическая конференция, посвященная 40-летию ВНИИВВиМ, Покров, 1998г. 139-145.
2. Сюрин В.Н. и др. Диагностика вирусных болезней животных. М. «Аг-ропромиздат», 1993 г. с. 141-237.
3. Лагуткин Н.А., Смирнов В.Н. Распространение вирусных агентов среди домашних птиц. МНК, г. Краснодар, с. 64-65, 1996г.
4. Лагуткин Н.А., Вишняков И.Ф., Кожемяка А.В. / Занос инфекционных болезней птиц. // Ветеринария, 1998, № 10: 7-10.
5. Gordon R.F., Iordan F.T.W. Poultry Diseases. Bailliere Tindal, London, 1983.
6. Pfitzer S., Verwogel D.J., Gerdes G.H. Newcastle Disease and avian influenza A virus in Wild Waterfowl in South Africa /Avian Dis., 2000, V 44 N 4: 665-660.

УДК: 619.576.8077

М.Л. Фридман, И.К. Абдрахманов

(ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко (ВИЭВ))

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОЖИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Еще в середине XX века общество обратило внимание на качественное и количественное уменьшение разнообразия живых существ, окружающих человека. Сегодня, когда рост численности и последствия хозяйственной деятельности человечества приводят к необратимым изменениям природы планеты, опасность исчезновения отдельных видов животных и целых экосистем особенно велика.

Невосполнимая утрата множества видов диких и домашних животных привела к осознанию человечеством ценности генетических ресурсов и их ограниченности.

В настоящее время эффективное со-

хранение и использование генетических ресурсов Земли рассматривается как один из факторов экономического благополучия как развитых, так и большинства развивающихся стран.

Таким образом, основной задачей для ученых стала разработка методик эффективного сохранения и использования генетического материала, поиск его легкодоступного источника.

Такие очевидные источники генетического материала как гаметы, кровь и т.д. нашли широкое применение, но их использование затруднено при работе с дикими животными. Дальнейшие изыскания привели

ученых к идее использования стволовых клеток. Такие уникальные свойства, как мультипотентность, самовозобновление и т.д. присущие исключительно стволовым клеткам, позволяют назвать их перспективным источником генетического материала.

На данный момент стволовые клетки обнаружены в большинстве тканей живых организмов и, в частности, в эпидермальном слое кожи. Эпидермис кожи млекопитающих состоит на 80-95% из кератиноцитов. Базальный слой кератиноцитов богат стволовыми клетками, что позволяет использовать кожу, как легкодоступный источник этих клеток. Взятие генетического материала из кожи позволит максимально обезопасить животных-доноров от травм и стрессов, связанных с этим процессом. Однако требуется разработка эффективных методик выделения и последующего культивирования кератиноцитов, а также изучение культурально-морфологических свойств полученных культур.

Культура кожной ткани является одной из первых полученных органных культур. Еще в 1898г. Ljungren культивировал в асцитной жидкости кусочки человеческой кожи, которые переживали в течение нескольких суток. Позднее многие исследователи культивировали экспланты кожи, применяя различные способы.

Одним из первых кто добился успеха в длительном культивировании клеток кожи, сохраняющих диплоидный кариотип, были Puck, Giescu, Robinson (1958).

Попытки культивирования клеток эпидермиса предпринимались давно, но, как правило, клетки либо дифференцировались, либо наблюдался рост фибробластов, привнесенных в культуру с последующим вытеснением кератиноцитов.

Проблема культивирования кератиноцитов человека более или менее была решена в 70-х годах после того, как были подобраны специальные питательные среды с различными добавками и подложки для культивирования клеток эпидермиса (Marcelo C.L., Kim Y.G., Kaine J.L., Voorhees J.Y., 1978; Milo G.F., Ackerman G.A., Noyes A., 1980; Peehl D.M., Ham R.G., 1980).

A.J.M. Vermorken, H. Bloemendal (1966) предложили способ культивирования кератиноцитов волосных фолликулов человека на капсуле хрусталика крупного рогатого скота в особой камере Epicult. Из одного волосного фолликула в первичной культуре получили 4-5×10⁴ диплоидных кератиноцитов, а при субкультивировании

до 5×10⁴ кератиноцитов.

Культура клеток кожно-мышечной ткани однодневных крольчат, полученная А.А. Поздняковым, Н.И. Гвозденко, А.Б. Бутахановым (1985) была представлена фибробластоподобными и эпителиоподобными клетками, которые характеризовались высокой пролиферативной активностью и устойчивостью в процессе культивирования при 41°C.

С.П. Баранова, Б.С. Вихриев, С.Ф. Маляхов, М.И. Блинова, Д.В. Кухарева, И.А. Дьяконов, Н.С. Николаенко, А.Д. Тартаковская, И.Ф. Боброва (1987) выяснили условия дезагрегации ткани и получения кератиноцитов кожи человека в возрасте 12-30 лет. Из различных видов подложки, проверенных на пригодность, лучшими оказались стеклянные чашки Петри, обработанные раствором коллагена из сухожилий хвоста крысы. При подборе питательных сред хорошие результаты были получены при использовании двух сред: среды Игла без ионов Са²⁺ и среды МСДВ-153, разработанной Хэмом для культивирования кератиноцитов человека.

В.В. Терских, А.В. Васильев и др. (1989) описывают 2 способа выращивания кератиноцитов:

1. Многослойный пласт кератиноцитов выращивают непосредственно на твердом субстрате, покрытом или непокрытом сорбированным коллагеном, или фидерном слое клеток ТЗ или эмбриональных фибробластов человека.

2. В качестве субстрата используют дермальный эквивалент, который образуется при инкубировании фибробластов человека в трехмерном гидротированном геле. Использование коллагенового геля в качестве подложки позволяет вводить в его состав компоненты экстрацеллюлярного матрикса (фибронектин, гиалуроновую кислоту, хондриотинсульфат), влияя на свойства дермального эквивалента и кератиноцитов. Эффективное выращивание пласта кератиноцитов было достигнуто в течение 15-20 суток при посеве 100 тыс. кл. на 1мл среды с добавлением сыворотки, инсулина, гидрокортизона, ЭФР и изопротеренола.

Для улучшения роста клеток, их укрепления и распластывания, успешно применяют коллагеновые подложки, которые, в свою очередь, влияют и на морфологию клеток.

В работе с культурами клеток кератиноцитов используют как среды, содержащие сыворотку, так и бессывороточные

питательные среды. Из общеупотребительных сред применяют среду Игла, Игла MEM, среду 199, среду RPMI-1640, F-12 [4, 5, 6, 16].

В последние годы получены селективные среды для культивирования кератиноцитов: МСДВ-153, полученная из МСДВ-152 с добавкой $ZnSO_4$ до $5 \times 10^{-6}M$, $FeSO_4$ до $5 \times 10^{-7}M$, которую разработал Ham R.G [19]. К среде МСДВ-153 добавляли EGF – 5 нг/мл, инсулин – 5 мкг/мл, гидрокортизон – 0,5 мкг/мл, 0,1мМ растворы этаноламина и фосфоэтанолламина. Содержание ионов Ca^{2+} составляло не более 0,03мМ. Для роста кератиноцитов человека на этой среде не требовались ни коллагеновая подложка, ни фидерные клетки.

Согласно литературным данным эффективный рост кератиноцитов может быть осуществлен при малых концентрациях эмбриональной бычьей сыворотки (0,1-0,5%) в присутствии бычьего гипофизарного экстракта (1,0-120мкг/мл) [4, 5, 6, 16]. Часто в питательную среду добавляют гормоны и факторы роста, которые влияют на дифференцировку и пролиферацию эпидермальных клеток: гидрокортизон, инсулин, EGF, холерный токсин оказывает сильное митогенное действие в концентрациях 10^{-8} - 10^{-14} , экстракт гипоталамуса, гипофизарный экстракт.

Однако, лишь совместное использование с другими ростовыми факторами обеспечивает резкое усиление митотической активности кератиноцитов в культуре. Фибронектин, нанесенный на поверхность флакона, усиливает распластывание клеток и обеспечивает их подвижность.

При культивировании эпидермальных клеток немаловажное значение имеет и температурный режим. Кератиноциты обычно культивируют при $37^{\circ}C$, но некоторое авторы считают оптимальной температуру $35^{\circ}C$, поскольку температура кожных покровов ниже температуры тела.

pH культуральной среды находится в пределах 7,2-7,4 по Dunn G.A., Ebendal T., (1978) предложили способ культивирования эпидермоцитов при pH 5,8, поскольку, в организме для эпидермиса характерна кислая среда.

Согласно литературным данным при культивировании клеток эпидермиса важное значение имеет катионный состав питательной среды. Концентрация ионов Ca^{2+} в среде является ключевым фактором в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток и оптимальной концентрацией кальция в среде считают 0,02-0,1мМ, потому как, при столь низких концентрациях внеклеточного кальция культуральная среда становится селективной - поддерживается рост эпидермальных клеток и полностью прекращается развитие фибробластов. Повышение же внеклеточного кальция ведет к усилению дифференцировки и уменьшению пролиферативной способности.

Изложенное позволяет заключить, что не разработаны оптимальные условия выделения и культивирования кератиноцитов, т.е. эпидермальных клеток кожи человека и животных, чему посвящено большое количество исследований для применения в медицине, ветеринарии и биотехнологии.

Литература

1. Васильев А.В., Волошин А.В., Терских В.В. Роль фидерных клеток в прикреплении и росте кератиноцитов человека и крысы. Цитология 1991;33:12:84 – 89
2. Малахов С.Ф., Терских В.В., Баткин Е.А., Васильев А.В., Парамонов Б.А. Аутооттрансплантация выращенных вне организма эпидермальных кератиноцитов с целью лечения обширных ожогов. Вестник хирургии им. Грекова 1993;4: 59-62.
3. Поздняков А.А., Гвозденко Н.И., Бутаханов А.Б. Получение культур клеток из различных тканей и органов кролика. 2 Всесоюз. Совещание. Пушкино. 26-28 ноября, 1985. Тезисы докладов. – 1985. – с.47-48.
4. Рысмендеева К.К. Сравнительное изучение чувствительности культур клеток кожи плода овцы и плода крольчихи к вирусу контагиозной эктимы овец и коз. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, ВИЭВ, 1992г.
5. Терских В.В., Васильев А.В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных. Проблемы культивирования и трансплантации. – М.: Наука, 1995. – 104с.
6. Терских В.В., Васильев А.В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных. Москва: Наука; 1999: 103.
7. Boucamp P., Petrussevska R. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line // J. Cell Biol. – 1988. – Vol 106. – P761-771.
8. Chiu M., O'Kufe E. Placental keratinocyte growth factor: partial purification and comparison with epidermal growth factor // Arch. Biochem. And Biophys. 1989. . Vol. 268, №1. . P75-81.
9. Compton C., Nadire K., Simon M. Cultured human sole-derived keratinocyte grafts re-express site-specific differentiation after transplantation // Differentiation. . 1998. . Vol. 64, № 11. . P45-53.
10. Compton C., Regauner S., Seiler J. Human Merkel cells regeneration in skin derived from cultured keratinocyte growth // Ibid. 1990. Vol. 63, № 8. P233-241.
11. Dunn G.A., Ebendal T. Contact guidance on oriented collagen gels. Exp.Cell Res. – 1978. – v.3. p.474-475.
12. Freeman A., Igel H., Herman B. et al. Growth and characterization of human skin epithelial cell cultures. In Vitro 1976;12(2):356-357.
13. Haggerty J., Milston L. Growth and differentiation regulate CD44 expression human keratinocytes //

- Soc. for in vitro Biol. – 1998.
14. Harris H., Bramwell M. The expression of malignancy by terminal differentiation: Evidence from hybrids between tumor cells and keratinocytes // Cell. Sci. – 1987. – Vol. 87. – P383-388.
 15. Hill M., Hillova J. Malignant transformation of human keratinocytes during adaptation to autotrophy // In vitro. – 1991. – Vol. 27, № 4. – P270-272.
 16. Keratinocyte methods by I. and F. Walt. Cambridge University Press 1994. P5_12.
 17. Ljungren C.A. (Цит. по Гаврилюк Б.К., Рочев Ю.А., Николаева Т.И. Органная культура ткани. В кн.: Культура клеток и реконструкция ткани (на примере кожи)). Пушино, 1988 – 32с.
 18. Marcelo C.L., Kim Y.G., Kaine J.L., Voorhees J.Y., Stratification, specialization and proliferation of primary keratinocyte cultures. J.Cell Biol. 1978. v.79. p.356-370
 19. Peehl D.M., Ham R.G., Growth and differentiation of human keratinocytes without a feeder layer of conditioned medium. In vitro. 1980. v.16. p.516-525.
 20. Puck T.T., Giecura S.J., Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells (3. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.). J. Exp.Med. – 1958. – v.108, №6, p.493-497.
 21. Rheiwald J.Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cells 1975;6: 331-344.
 22. Vermorken A.J.M., Bloemendal H. Human hair follicle cell in culture; the development of a new culture system and its potential applications. Mol. Biol.Repts. – 1986. – v.11, №11, p.3-12.
 23. Zhang Y. Mixed keratinocyte culture and its composite skin graft // Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih. –1993. – № 9(1). – P37-40.

УДК: 636.2:636.082.4

**Е.Б. Шукярова, Н.С. Марзанов, Ю.В. Саморуков, Л.И. Хуторов,
А.Н. Попов, Е.И. Кийко, Н.Г. Букаров, В.М. Игнатьев
(ДВНИИСХ)**

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Более чем десятилетняя деятельность зональной лаборатории иммуногенетики при Дальневосточном НИИ сельского хозяйства (ДВНИИСХ) позволила накопить определенный опыт использования генетических маркеров в селекционно-племенной работе в условиях Дальневосточного региона. Проводимые исследования направлены на выявление достоверности происхождения племенного молодняка из различных краев и областей региона; оценку генетической структуры стад, формируемых за счет целенаправленного подбора к ним определенных быков-производителей; оценку формируемых популяций КРС на устойчивость к различным заболеваниям.

Целью работы является: определение достоверности происхождения телят, выявление генотипов у формируемого дальневосточного типа черно-пестрого скота по 9 системам групп крови из различных областей и краев Дальневосточного региона; изучение генетической структуры дойного стада ГОПХ «Восточное» Хабаровского края, где проведен анализ групп крови 510 коров дойного стада.

Группы крови КРС определяли по общепринятой методике с использованием 48-54 наименований сывороток-реагентов

9-10 генетических систем (Сороковой П.Ф., 1974). Обработку полученных материалов проводили в соответствии с методическими рекомендациями Машурова А.М. и др. (1998). Диагностику маститов осуществляли в соответствии с «Методическими указаниями по диагностике, лечению и профилактике маститов, 1986». Носительство гена BLAD-синдрома определяли по описанной схеме Марзановым Н.С. и др. (2003).

В настоящее время в Дальневосточном регионе аттестовано 16380 племенных животных из них на достоверность происхождения 7835 голштинской, черно-пестрой и герефордской пород из Хабаровского и Приморского краев, Амурской и Сахалинской областей и Еврейской АО. В результате проведенных исследований в среднем по региону выявлено, что у 22,2% КРС имеются ошибочные записи в родословных. При этом причиной ошибки происхождения по отцовской линии являлись небрежность проводимых племенных записей, использование при искусственном осеменении спермы другого производителя. Причины не достоверности по матерям были в результате были в результате ошибок при лечении телят. Было установлено также, что ошибочность записи происхождения потомка может иметь под собой