

На правах рукописи



**ВАЛЕЕВА Анна Рафкатовна**

**ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ ПРИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ**

**06.02.05 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и  
ветеринарно-санитарная экспертиза**

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

**А в т о р е ф е р а т**  
**диссертации на соискание учёной степени**  
**кандидата биологических наук**

**Уфа - 2017**

Работа выполнена в Институте экологии и природопользования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научные руководители: **Мукминов Малик Нилович**,  
доктор биологических наук, доцент  
**Шуралев Эдуард Аркадьевич**,  
кандидат ветеринарных наук, доцент

Официальные оппоненты: **Юсупова Галия Расыховна**,  
доктор биологических наук, профессор кафедры  
ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО  
«Казанская ГАВМ»  
**Семенов Владимир Григорьевич**,  
доктор биологических наук, профессор кафедры  
морфологии, акушерства и терапии ФГБОУ ВО  
«Чувашская ГСХА», заслуженный деятель науки  
Чувашской Республики

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАН»

Защита состоится «15» декабря 2017 г. в 13.00 час. на заседании диссертационного совета Д 220.003.02 при ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет» по адресу: 450001, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, тел. 8 (347) 228-91-77, факс 8 (347) 228-08-98.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», [www.bsau.ru](http://www.bsau.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор ветеринарных наук



Каримов Фоат Ахметович

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень её разработанности.** Урбанизация, рост потребностей населения, развития промышленности и сельского хозяйства приводят к экологическому дисбалансу среды обитания, где особое место занимают такие поллютанты, как тяжелые металлы (Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Рубченков П.Н., 2010; Донник И.М., Шкуратова И.А., 2011; Конюхова В.А., Папуниди К.Х., Кузина М.В., Тремасов М.Я., 2012; Дорожкин В.И., Кроль М.Ю., 2014). Приоритетным из них и вторым по санитарно-токсикологической опасности является кадмий, способный накапливается в мышечной ткани, почках и печени (Донник И.М., Шкуратова И.А., Хасина Э.И., Якубенко Е.В., 2012; Кадиков И.Р., 2015), вызывать цитолитические структуры, запускать некротические и дистрофические процессы с активацией синтеза металлопротеинов, процессов перекисного окисления липидов, и увеличением концентрации малонового альдегида (Степанова Е.В., Слюзова О.В., Бучарская А.Б., Киреев Р.А., Игнатов В.В., 2008; Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Баранова А.А., 2013; Мирзоев Э.Б., Кобялко В.О., Губина О.А., Фролова Н.А., 2014). Высокая заболеваемость туберкулезом среди людей и животных обусловлена возможностью перекрестного заражения и сохранения жизнеспособности возбудителя под действием внешних неблагоприятных факторов (Смирнов А.М., 2004; Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Гулюкин М.И., Букова Н.К., 2015; Nugent G., 2011). На фоне кадмиевой интоксикации усугубляется течение инфекционного процесса (Bozelka V.E., Burkholder P.M., 1979; Застенская И.А., Лысенко А.П., Кочубинский В.В., Кочубинский А.В., 2014), нарушаются показатели естественной резистентности, гемопоэза, клеточного и гуморального иммунитета (Жоров Г.А., Рубченков П.Н., Обрывин В.Н., 2011; Ткаченко Е.А., Дерхо М.А., 2015).

**Целью исследования** являлась комплексная оценка влияния хронической кадмиевой интоксикации на показатели естественной резистентности и специфического иммунитета кроликов при инфицировании *Mycobacterium bovis*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить динамику изменения показателей естественной резистентности;
2. Получить и оценить диагностическую значимость антигенов из экстракта клеток и вторичных метаболитов микобактерий *M.bovis*;
3. Оптимизировать метод непрямого иммуноферментного анализа на основе полученных антигенов для оценки гуморального иммунного ответа;
4. Изучить влияние кадмия на антителообразование в динамике патогенеза туберкулеза;
5. Провести послеубойную ветеринарно-санитарную экспертизу органов экспериментальных животных на предмет содержания кадмия и *M.bovis*.

**Научная новизна.** Впервые изучено влияние хронической кадмиевой интоксикации на показатели состояния здоровья животных при патогенезе туберкулеза. Определена диагностическая значимость полученных антигенов

из экстракта клеток и вторичных метаболитов *M.bovis*. Оптимизированы условия и режимы постановки непрямого иммуноферментного анализа с использованием полученного антигенного материала. Показано негативное влияние хронической кадмиевой интоксикации на специфический иммунный ответ при туберкулезе.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании проведенных исследований установлено усугубление противотуберкулезного иммунитета под влиянием хронической интоксикации кадмием. Усовершенствован метод непрямого иммуноферментного анализа для оценки специфического гуморального противотуберкулезного иммунитета. Научно обоснована эффективность мультиантигенного подхода в серодиагностике туберкулеза. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при чтении курсов: «Экологическая эпидемиология» и «Основы биологической безопасности». Разработаны «Технологический регламент получения антигена из клеточной стенки *Mycobacterium bovis* Bovinus-8» (утвержден заместителем директора по НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 07.07.2016), «Способ получения гипериммунной сыворотки к микобактериальным антигенам. Методические рекомендации» (одобрены научно-методическим советом ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», протокол №4 от 29.12.2016; утверждены директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 29.12.2016).

**Степень достоверности результатов.** Научные результаты получены с использованием современных методов исследований. Экспериментально полученные числовые данные подвергались статистической обработке с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на итоговых научных конференциях ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (2012-2016 гг.); III Междунар. науч. интернет-конф. «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий» (Казань, 2012); IV Междунар. Казанском инновационном нанотехнологическом форуме «NanoTech'2012» (Казань, 2012); II Всероссийс. науч. конф. с междунар. участ. «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов» (Казань, 2013); IV и V Междунар. науч.-практ. конф. «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2014, 2015); Всероссийс. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Актуальные направления инновационного развития животноводства и ветеринарной медицины» (Уфа, 2014); Междунар. науч.-практ. конф. «Инновационные подходы к решению современных проблем ветеринарной медицины» (Екатеринбург, 2015); Междунар. науч. конф. «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования» (Казань, 2016).

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Влияние хронической кадмиевой интоксикации на показатели состояния здоровья животных при патогенезе туберкулеза.

2. Обоснование мультиантигенного подхода в серодиагностике туберкулеза.

3. Динамика специфического иммунного ответа при туберкулезе на фоне хронической кадмиевой интоксикации.

4. Патогенез и морфофункциональные изменения внутренних органов и тканей при туберкулезе на фоне хронической кадмиевой интоксикации.

**Публикации.** Основное содержание диссертационной работы представлено в 17 публикациях, включая 5 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация имеет объём 158 страниц, иллюстрирована 18 рисунками и 16 таблицами. Библиографический список содержит 208 литературных ссылок, в т.ч. 53 на иностранных языках.

**Методы исследования.** В исследовании использовали модельных животных – кроликов (табл. 1), штаммы *M.bovis* Bovinus-8 и *M.tuberculosis* H37Rv. Хроническую интоксикацию вызывали хлоридом кадмия ( $CdCl_2$ ).

**Таблица 1 – Схема опыта на модельных животных**

Группа	Хроническая интоксикация	Инфицирование
1 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально $CdCl_2$ - 1,5 мг/кг	подкожно 1 мл физиологического раствора
2 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально плацебо (вода)	подкожно 1 мл суспензии <i>M.bovis</i> Bovinus-8 (10 ЕДм.т./мл)
3 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально $CdCl_2$ - 1,5 мг/кг	подкожно 1 мл суспензии <i>M.bovis</i> Bovinus-8 (10 ЕДм.т./мл)
4 n=3	ежедневно в течение 60 сут перорально плацебо (вода)	подкожно 1 мл физиологического раствора

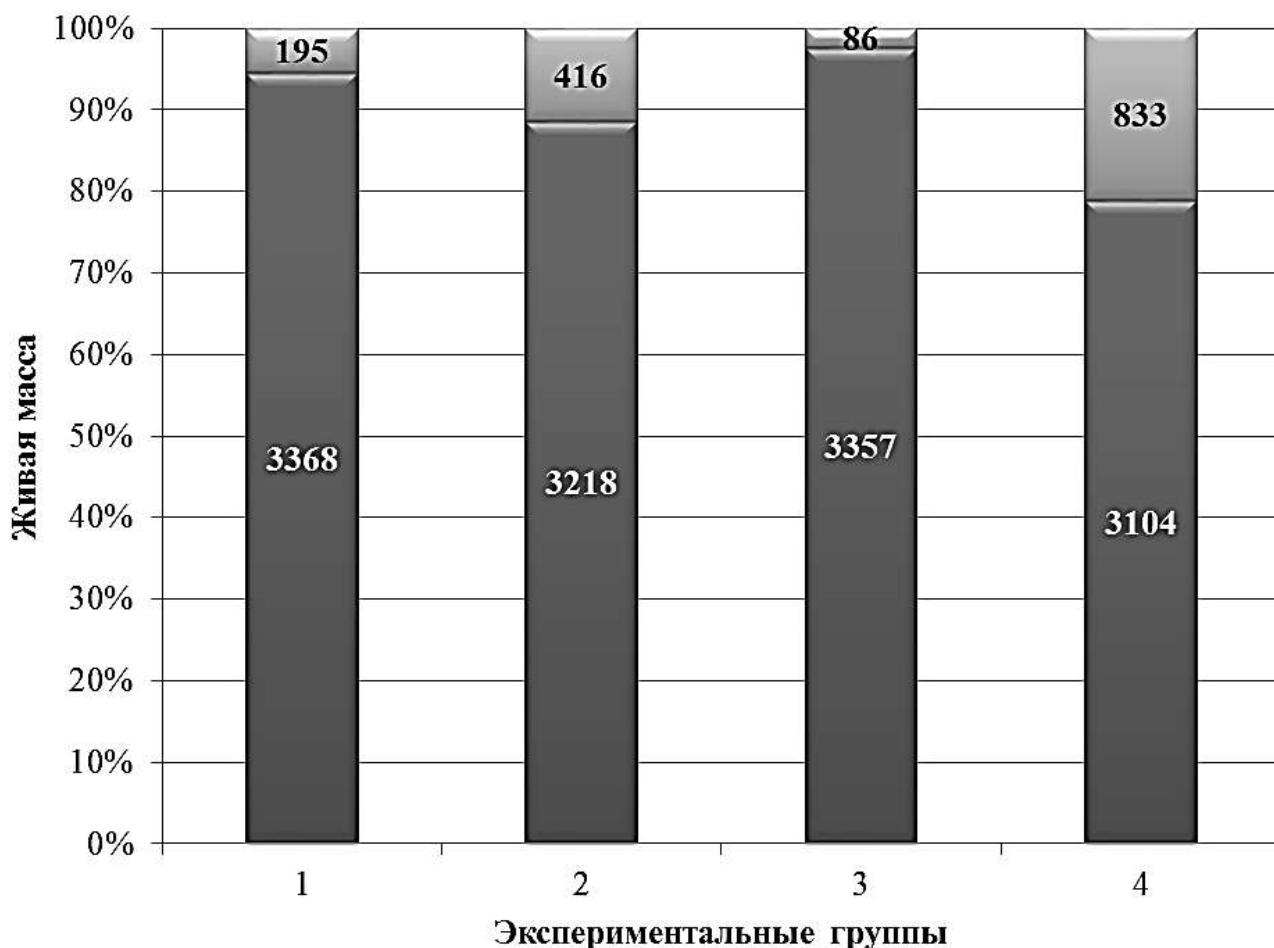
В рамках эксперимента применяли клинические, клинико-биохимические, гематологические, иммунологические, иммунохимические, гистологические, патоморфологические, микробиологические, молекулярно-генетические, токсикологические и статистические методы.

## 2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1 Показатели естественной резистентности организма кроликов, инфицированных *Mycobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия

**2.1.1 Физиологические показатели.** При затравке хлоридом кадмия наблюдали на первом этапе повышение температуры тела, а при инфекционном процессе – понижение, с дальнейшим волнообразным изменением у животных всех экспериментальных групп. К концу эксперимента значения достигали в 1-ой группе уровня  $39,00 \pm 0,21^\circ C$ , во 2-ой –  $38,76 \pm 0,15^\circ C$  и в 3-ей –  $39,00 \pm 0,37^\circ C$ .

В 1-ой, 2-ой и 3-ей группах установили значительное замедление роста и развития кроликов (рис. 1). К 60 сут эксперимента в 1-ой группе абсолютный прирост живой массы составил 6%, во 2-ой – 13%, в 3-ей – 3%, а в 4-ой – 27%.



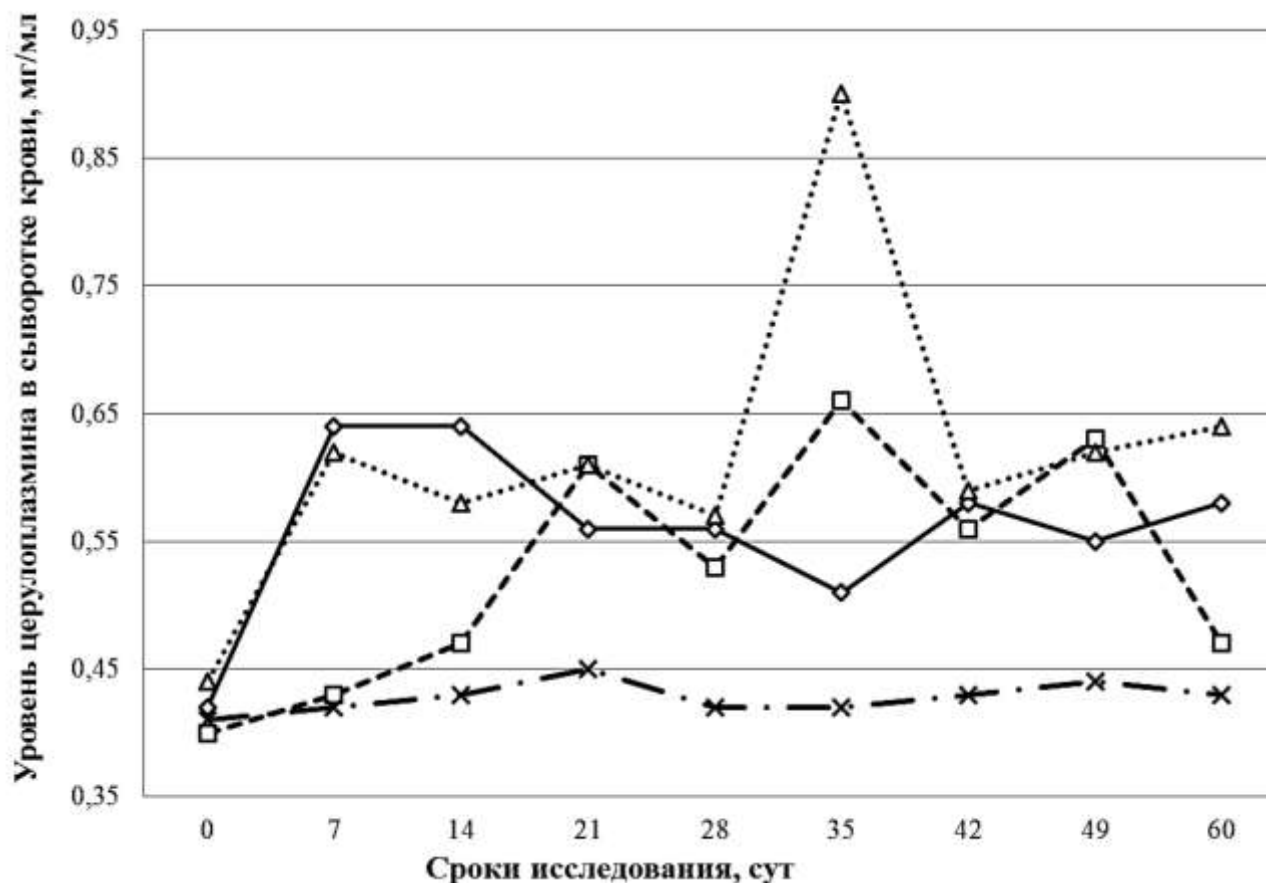
**Рисунок 1 – Прирост массы тела кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации  $CdCl_2$ , г**

- Абсолютный прирост живой массы
- Живая масса экспериментальных животных (фон)

**2.1.2 Биохимические показатели сыворотки крови.** Содержание общего белка (ОБ) в сыворотке крови кроликов 1-ой, 2-ой и 3-ей групп был несколько выше значений 4-ой. Уровень ОБ изменялся волнообразно, достигая максимального значения в 1-ой группе на 28 сут, а в 3-ей группе на 21 сут эксперимента, на 26% и 24% выше уровня интактных животных соответственно. У кроликов 2-ой группы значения ОБ на 42 сут превышали уровень 4-ой на 29%. Изменения показателей альбуминовой фракции сыворотки крови в динамике у кроликов 1-ой и 3-ей групп характеризовались двумя пиками на 14 и 35 сут эксперимента, а 2-ой группе достигала максимального значения на 42 сут эксперимента. Альбумин глобулиновый индекс (А/Г) держался в большинстве случаев в пределах нормы. Некоторое понижение А/Г отмечалось во 2-ой и 3-ей группах.

При анализе активности сывороточных ферментов выявлена корреляция показателей с хронической интоксикацией и течением инфекционного процесса. В 1-ой группе наблюдали волнообразную динамику изменения аспартатаминотрансферазы (АСТ) с тенденцией к снижению, а уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) – повышался. Изменения активности указанных ферментов во 2-ой группе характеризовались двумя пиками – на 21

и 35 сут. У животных 3-ей группы наблюдалась сходная картина, однако наибольшие значения АСТ и АЛТ выявлены на 14 и 35 сут. Концентрация церулоплазмينا (ЦП) в сыворотке крови кроликов 1-ой группы на 14 сут исследования повышалась и достигала значений, на 50% выше уровня 4-ой (рис. 2). Во 2-ой и 3-ей группах после инфицирования *M.bovis* кривая динамики изменения ЦП имеет 2 характерных пика на 7 и 35 сут.



**Рисунок 2 – Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации CdCl<sub>2</sub>, мг/мл**

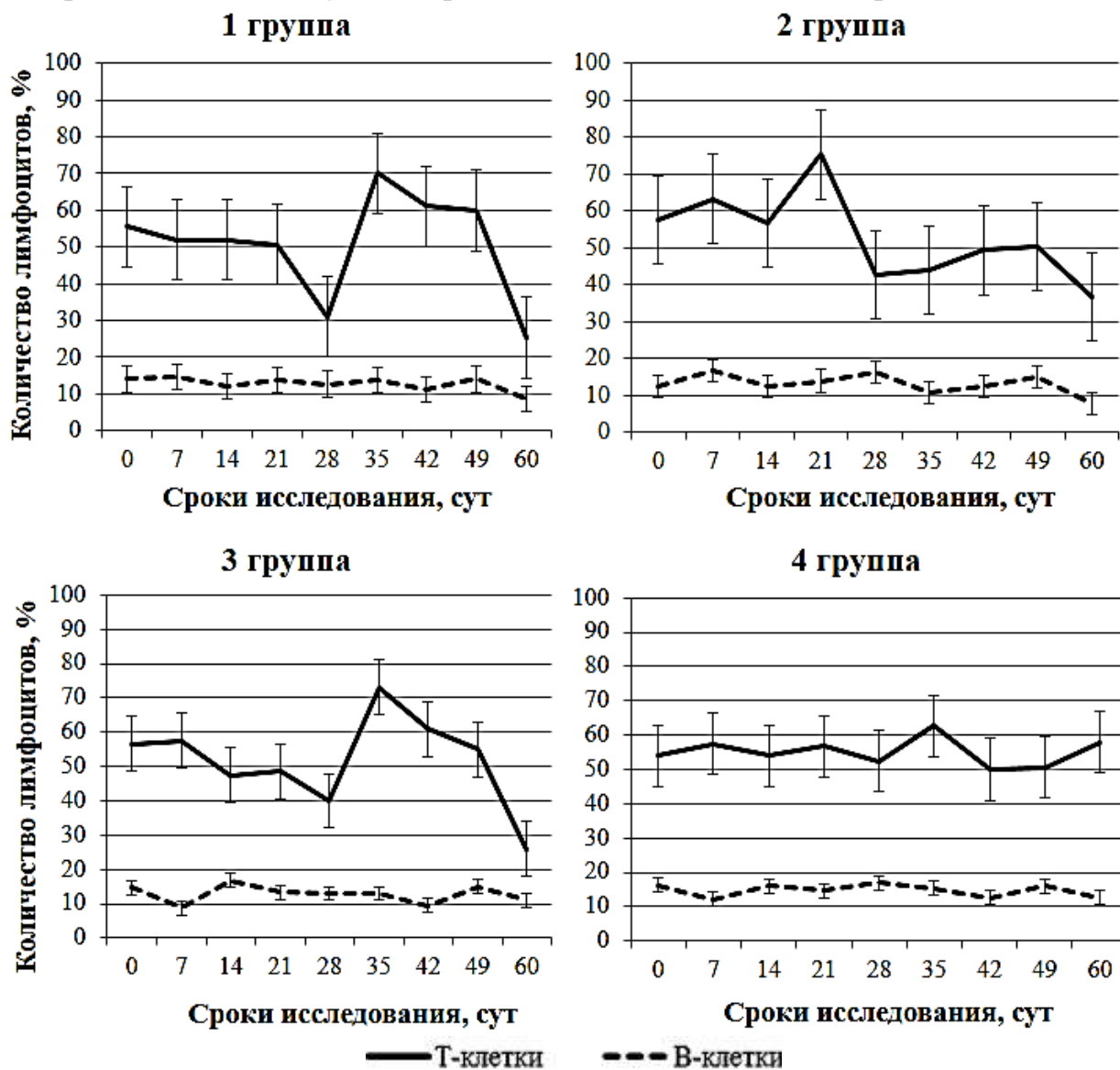
- ◆— 1 группа (хроническая интоксикация CdCl<sub>2</sub>);
- 2 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8);
- △·· 3 группа (инфицирование *M.bovis* Bovinus-8 на фоне хронической интоксикации CdCl<sub>2</sub>);
- \*— 4 группа (интактные животные)

**2.1.3 Гематологические показатели.** При гематологическом исследовании выявлено, что у кроликов всех экспериментальных групп наблюдалось нарастание уровня лимфоцитов. Во 2-ой и 3-ей группах после инфицирования увеличивалось количество нейтрофилов, лейкограмма характеризовалась сдвигом вправо, выявлена моноцитопения, что является прогностически неблагоприятным синдромом, приводящим к снижению естественной резистентности организма.

Динамика изменений относительного содержания иммунокомпетентных клеток крови характеризовалась тем, что уровень содержания В-лимфоцитов в крови животных 1-ой, 2-ой и 3-ей группы достоверно не отличался от

показателя 4-ой и варьировал в пределах от  $8,00 \pm 2,00$  до  $16,75 \pm 2,50\%$  (рис. 3).

Инфекционный процесс во 2-ой группе характеризовался понижением уровня содержания Т-клеток на 28 сут эксперимента. В 1-ой и 3-ей группах выявлено постепенное снижение числа Т-лимфоцитов к середине эксперимента, с последующим резким его подъемом и повторным снижением.



**Рисунок 3 – Уровень относительного содержания иммунокомпетентных клеток в крови кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации  $CdCl_2$**

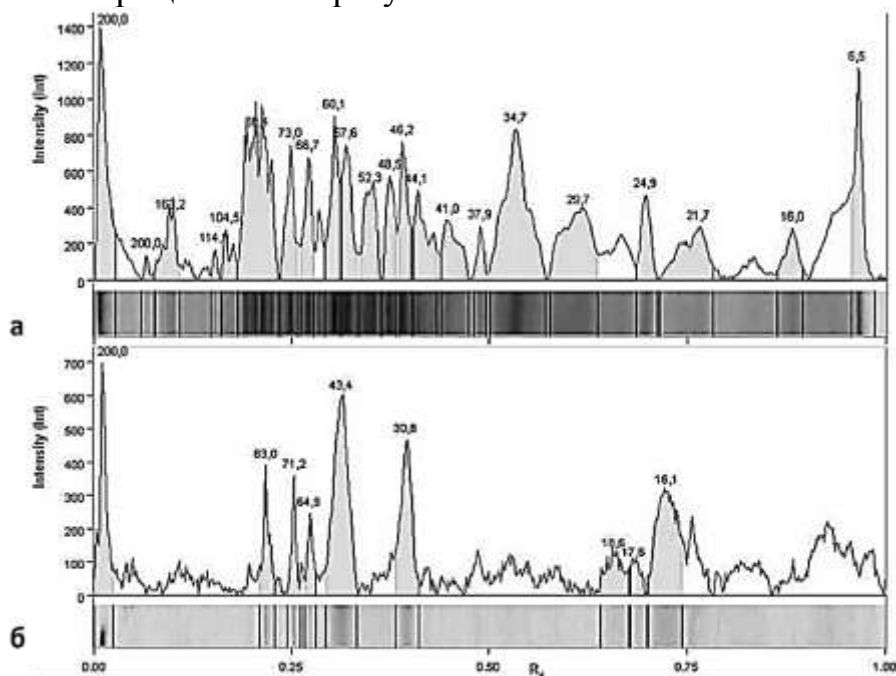
## 2.2 Специфический иммунный ответ кроликов при экспериментальном инфицировании *Mycobacterium bovis* и влияние хлорида кадмия на антителогенез

### 2.2.1 Оптимизация метода непрямого иммуноферментного анализа для оценки гуморального иммунного ответа.

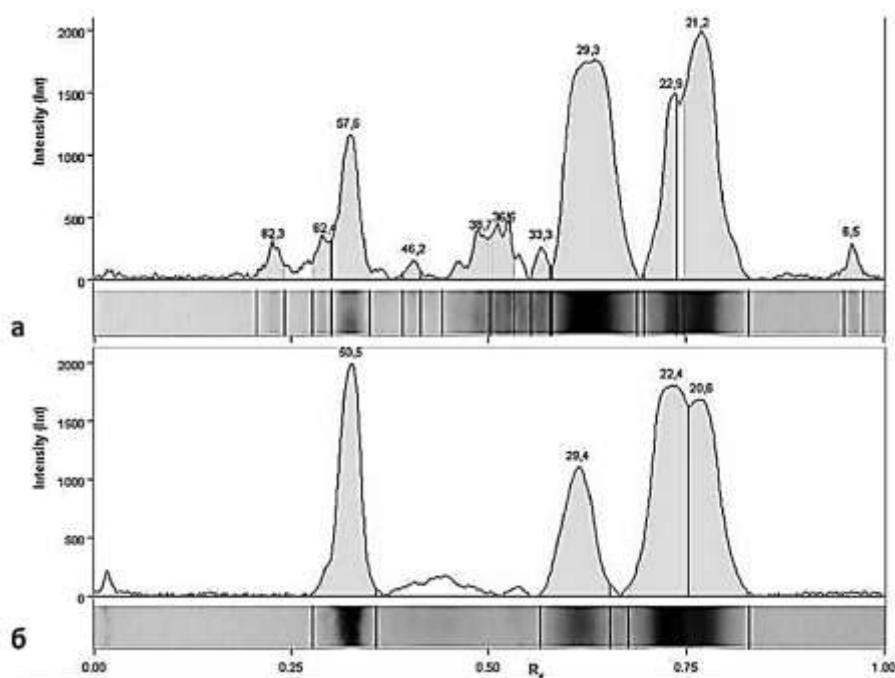
При анализе электрофоретического фракционирования был выявлен широкий спектр структурных компонентов *M.bovis* Bovinus-8, распределяющийся в диапазоне молекулярных масс 200-6,5 кДа для экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8 и 200-16,1 кДа для их вторичных метаболитов (рис. 4).



В реакции иммуноблот с гипериммунной сывороткой кролика против *M.bovis* Bovinus-8 выявили несовпадение с результатами аналитического электрофореза (рис. 5), реагировали фракции антигена, полученного из вторичных метаболитов, с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а из экстракта клеток – от 82,3 до 6,5 кДа. Однако спектр полученных препаратов охватывает комплекс диагностически значимых антигенов, что исключает получение ложноотрицательных результатов.



**Рисунок 4 – Денситограмма электрофореза антигенного материала из экстракта клеток (а) и вторичных метаболитов (б) *M.bovis* Bovinus-8 в 12,5%-ном полиакриламидном геле, окрашивание азотнокислым серебром**

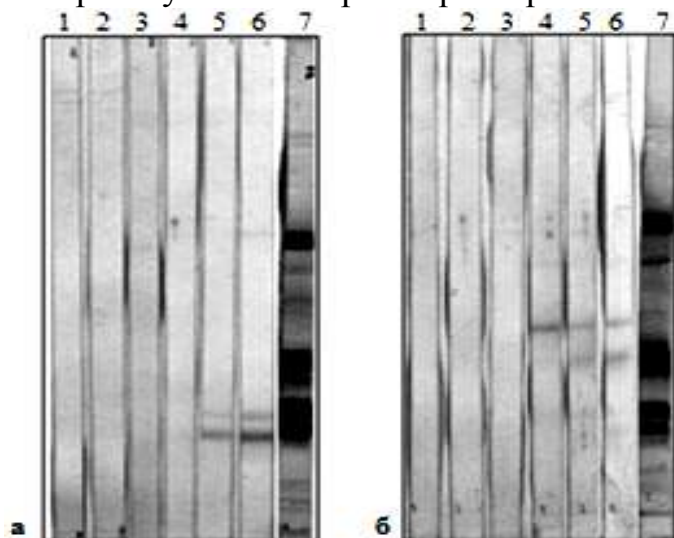


**Рисунок 5 – Денситограмма иммуноблота антигенного материала из экстракта клеток (а) и вторичных метаболитов (б) *M.bovis* Bovinus-8 с гипериммунной кроличьей сывороткой крови против клеток *M.bovis***

При оптимизации условий и режимов постановки непрямого ИФА для изучения показателей специфического иммунного ответа, выявлено оптимальное для постановки реакции разведение антигенного материала, при котором достигается минимальное значение фона реакции – 1:100 на 0,2М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе с рН 9,6. Установлено, что наиболее приемлемым для постановки ИФА разведением исследуемых сывороток являлось 1:100 в 0,1М фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,2-7,4 с 0,5% твина-80 (ФБР-Т) и режимом инкубации – 40 мин при 37°С с последующей 5-кратной промывкой ФБР-Т. При этом условия инкубирования и отмывки были оптимальны и на этапе внесения антивидового конъюгата, который применяли в рабочем разведении 1:60000. Для проявления реакции в лунки планшета вносилась субстратная смесь ТМБ, инкубация проходила при комнатной температуре в течение 10 мин. Для остановки реакции использовали 1М раствор серной кислоты. Наилучшее считывание результатов реакции наблюдали при длине волны 450 нм и референсном фильтре со значением 655 нм. При таких условиях и режимах постановки ИФА с гипериммунной сывороткой оптическая плотность (ОП) достигала 3,500 ОЕ при использовании экстракта клеток и 3,203 ОЕ – вторичных метаболитов.

**2.2.2 Оценка специфического иммунитета при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации хлоридом кадмия.** В результате ИФА выявили, что во 2-ой группе, антителогенез проявлялся, начиная с 14-28 сут после инфицирования. ОП 5-7-кратно превышала показатели животных до инфицирования и интактных при использовании в качестве антигена экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8 и не более чем в 4 раза при использовании их вторичных метаболитов. При этом уровень антител в сыворотке крови был стабилен до конца срока наблюдения, ОП достигала 1,177 ОЕ и 0,238 ОЕ соответственно. В 3-ей группе специфические антитела обнаруживались только на 28-42 сут после инфицирования. При этом значения ОП достигали 0,947 и 0,221 ОЕ соответственно.

Высокой серологической активностью обладали фракции, локализованные в низкомолекулярной зоне – 31-24 кДа (рис. 6), тогда как гипериммунная сыворотка реагировала с фракциями в диапазоне 82,3-6,5 кДа.



**Рисунок 6 – Иммуноблот с сывороткой крови кролика, инфицированного *M.bovis* на фоне хронической интоксикации  $CdCl_2$ , в динамике инфекционного процесса:**

**а** – экстракт клеток,  
**б** – вторичные метаболиты клеток;  
**1** – 0, **2** – 7, **3** – 14, **4** – 21, **5** – 28,  
**6** – 42 сут после инфицирования,  
**7** – гипериммунная сыворотка кролика против *M.bovis*

По-видимому, образование связей в реакции «антиген-антитело» специфичных иммунных компонентов исследуемых сывороток крови кроликов с низкомолекулярными фракциями связано с особенностями иммунного ответа животных 3-ей группы.

### 2.3 Постморальные исследования внутренних органов и тканей кроликов, инфицированных *Mycobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации кадмием

**2.3.1 Патоморфологические и гистологические исследования.** При осмотре внутренних органов животных экспериментальных групп выявили патоморфологические изменения внутренних органов. Окрас печени варьировал от яркого красно-коричневого до коричневого, встречались неоднородное окрашивание и мелкие очаги измененной ткани, увеличивался объем органа, округлялись края. Массовый коэффициент печени кроликов 1-ой, 2-ой и 3-ей групп был выше контроля на 25, 28 и 26% соответственно (табл. 2).

**Таблица 2 – Абсолютная и относительная масса печени кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации  $CdCl_2$  ( $M\pm m$ )**

Группа	Показатель		
	общая масса тела, г	абсолютная масса печени, г	относительная масса печени, %
1	3563±301	87,08±1,31	2,33±0,14*
2	3634±203	83,59±8,04	2,39±0,23
3	3443±349	81,22±0,35	2,35 ±0,22
4	3937±216	76,2±2,10	1,86±0,10

Примечание: \*  $p\leq 0,05$  относительно показателя контрольной группы

Селезенка кроликов всех экспериментальных групп была увеличена, имела неправильную форму с латеральными и дорсальными отростками и бурым окрасом. Массовый коэффициент селезенки был выше показателя 4-ой группы на 78% в 1-ой, 2-ой группах и в 2 раза в 3-ей группе (табл. 3). При фотометрии выявили наибольшее патоморфологическое изменение селезенки у особей 3-ей группы. Соотношение длины селезенки к ширине в данной группе составило 19,32%, тогда как в 1-ой, 2-ой и 4-ой группах 18,2%, 16,52% и 14,4% соответственно.

**Таблица 3 – Абсолютная и относительная масса селезенки кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации  $CdCl_2$  ( $M\pm m$ )**

Группа	Показатель		
	общая масса тела, г	абсолютная масса селезенки, г	относительная масса селезенки, %
1	3563±301	2,01±0,55	0,05±0,02
2	3634±203	1,89±1,50	0,05±0,04
3	3443±349	2,06±0,64	0,06±0,03
4	3937±216	1,10±0,10	0,03±0,01

Примечание: \*  $p\leq 0,05$  относительно показателя контрольной группы

Гистологическими исследованиями обнаружены нарушения балочного строения печени у животных 1-ой и 3-ей групп. Гепатоциты, расположенные в центре долек, имели нечеткое строение со слабо выраженными контурами. Центролобулярные вены были неравномерно расширены, заполнены эозинофильными массами, лейкоцитами и лимфоцитами. У кроликов 2-ой группы в печени изменения варьировали от набухания гепатоцитов, до частичного нарушения балочного строения.

Наиболее выраженные изменения почек выявлены в 3-ей группе. Обнаружено набухание клеток эпителия извитых канальцев. В просветах капсул клубочков и извитых канальцев были видны некоторые скопления эозинофильных масс. Наибольшие изменения гистологических структур тканей легкого выявлены у кроликов 2-ой и 3-ей групп. У инфицированных животных установлено неравномерное кровенаполнение, скопления полиморфных клеток и фолликулоподобных структур, в центре которых можно было увидеть эозинофильные массы и распадающиеся лейкоциты. В легких кроликов 1-ой группы стенки артериальных сосудов были несколько утолщены, но структура их сохранена. В селезенке кроликов 1-ой, 2-ой и 3-ей групп наблюдали скопление лимфатических клеток с признаками распада. Кроме того, в 3-ей группе выявлены малочисленные фолликулярные структуры и скопление лимфоцитов вокруг сосудов.

**2.3.2 Бактериологические исследования и молекулярно-генетический анализ.** В результате посева суспензий, приготовленных из органов кроликов, микобактерии были выделены из сердца, печени, почек, легких, лимфатических узлов и миндалин у кроликов 3-ей группы, а во 2-ой – в тех же органах, кроме миндалин и легких. Индекс инфицированности во 2-ой и 3-ей группах составил 78 и 85% соответственно.

Видимый рост клеток при культивировании микобактерий, выделенных из органов животных 3-ей группы, наблюдали через 5 недель, тогда как контрольный штамм и клетки, выделенные из органов кроликов 2-ой группы, давали рост, начиная с 3 недели. Методом ПЦР при анализе продуктов амплификации в пробах животных 2-ой и 3-ей групп обнаружена ДНК аналогичная нуклеотидной последовательности исходной (нативной) культуры. При этом фракционированием в ПААГ выявлено некоторое различие в полипептидном спектре разрушенных клеток, выделенных из органов кроликов 3-ей группы, по сравнению с контрольным штаммом.

**2.3.3 Остаточное содержание кадмия в органах и тканях.** При определении остаточного содержания кадмия выявили большее накопление металла в органах и тканях животных 3-ей группе, чем в 1-ой. У животных 3-ей группы Cd обнаружили в печени, почках, легких, селезенке, сердце, мышечной и костной тканях, тогда как в костной ткани кроликов 1-ой группы Cd не обнаружен. Наибольшее накопление наблюдали в печени (6,5 мг/кг в 1-ой, 14,72 мг/кг в 3-ей группе) и почках (7,6 и 44,54 мг/кг соответственно).

## 2.4 Ветеринарно-санитарная экспертиза продуктов убоя кроликов, инфицированных *Mycobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия

При анализе результатов ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и продуктов убоя кроликов 1-ой, 2-ой и 3-ей групп установлено их несоответствие гигиеническим требованиям, предъявляемым к безопасности и качеству пищевых продуктов. Результаты органолептического осмотра, указывают на патологоанатомические изменения печени и селезенки. Гистологические исследования подтверждают структурные изменения селезенки, печени, почек и легких. При анализе микробиологических исследований установлено туберкулезное поражение внутренних органов животных групп инфицирования. Кроме того, в почках кроликов 1-ой и 3-ей групп выявлено превышение допустимого уровня кадмия для субпродуктов убойных животных в 7,5 и более 40 раз соответственно (рис. 7). В печени количество металла было выше ПДУ в 21 раз в 1-ой группе и в 50 раз в 3-ей. В селезенке обнаружено 4-5-кратное превышение ПДУ по Cd. В мясе кроликов 1-ой группы количество металла было выше ПДУ на 60%, а в 3-ей уровень Cd превышал его в 2,5 раза.

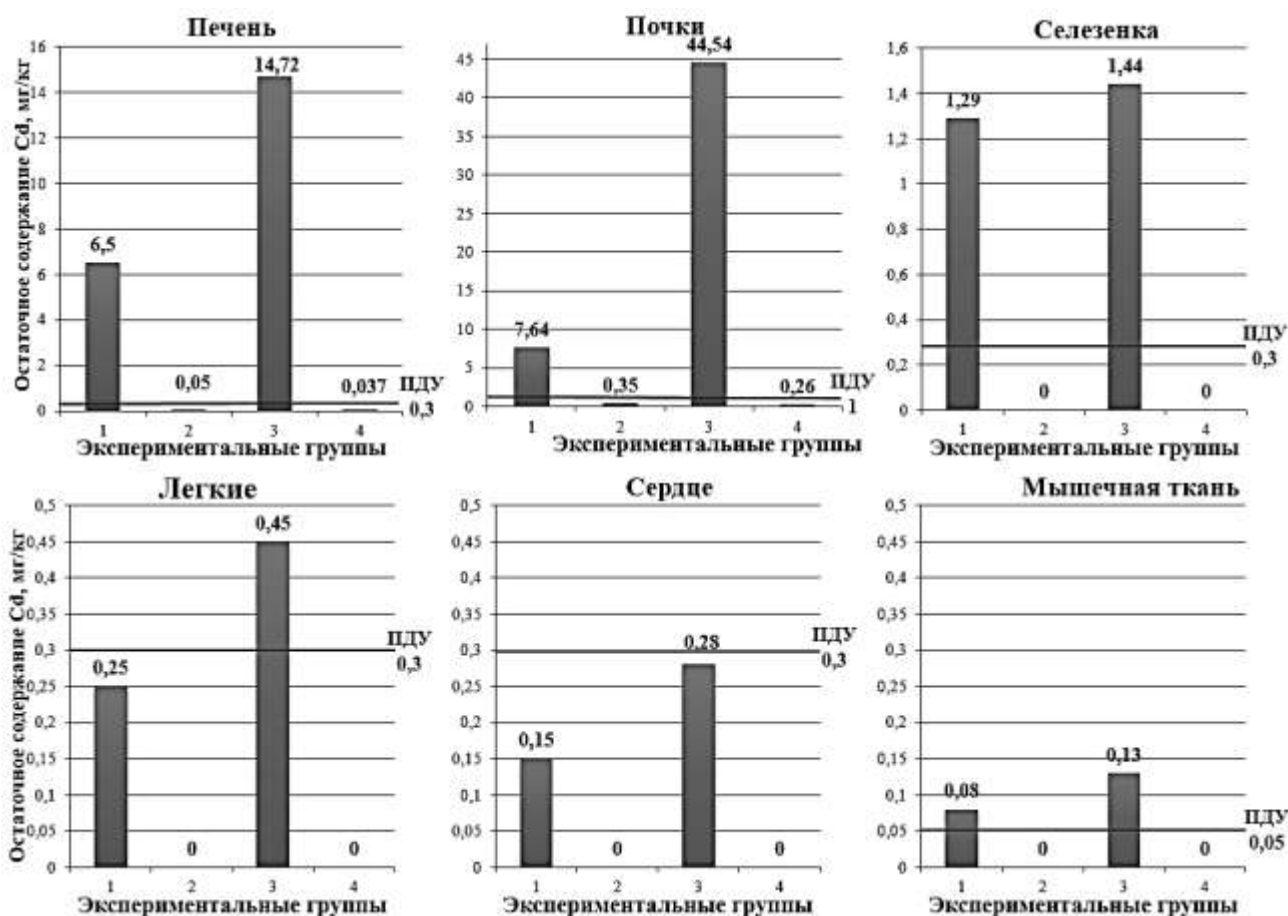


Рисунок 7 – Уровень содержания Cd в мясе и продуктах убоя кроликов, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической интоксикации  $CdCl_2$ , мг/кг

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследований сформулированы следующие **выводы**:

1. Комплексным исследованием установлено угнетающее воздействие хронической кадмиевой интоксикации на естественную резистентность и специфический иммунный ответ при патогенезе туберкулеза.

2. При инфицировании кроликов микобактериями туберкулеза бычьего типа на фоне хронической интоксикации малыми дозами хлорида кадмия выявлено замедление роста и развития, прирост живой массы составляет 3% против 6% в группе интоксикации, 13% в группе инфицирования и 27% у интактных животных.

3. Установлены нарушения белковообразовательной функции печени и изменения активности сывороточных ферментов, свойственные как токсическому поражению, так и патогенезу туберкулеза. Показатели уровня белковых фракций у животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, превышали значения контрольной группы на 9-13% (достигая уровня  $1,27 \pm 0,40$  г/дл для  $\alpha$ - и  $0,87 \pm 0,06$  г/дл для  $\beta$ -глобулинов), а динамика изменения уровня  $\gamma$ -глобулина характеризовалась резким увеличением концентрации на 21-е и 35-е сутки до  $2,40 \pm 1,25$  г/дл, что в 2 раза превышает показатель интактных кроликов ( $p < 0,05$ ). Наибольшие значения АСТ и АЛТ выявлены на 14 и 35 сут исследования ( $268,97 \pm 34,58$  нкат/л и  $577,70 \pm 19,69$  нкат/л, соответственно). Уровень ЦП достигал максимальных значений на 35 сут,  $1,10 \pm 0,45$  мг/мл, что превышало показатели остальных групп в 1,5-2 раза ( $p < 0,05$ ).

4. Выявлены более выраженные изменения показателей лейкоцитарной формулы, которые указывают на тяжесть проходящих в организме кроликов процессов и ослабление неспецифических иммунных реакций, что проявляется в угнетении функциональной активности В-лимфоцитов и гуморального иммунного ответа, и в подавлении выработки Т-лимфоцитов, с усугублением противотуберкулезного клеточного иммунного ответа. Уровень Т-лимфоцитов в крови животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, к концу эксперимента (60 сут исследования) снижался до  $26,00 \pm 8,49\%$ , тогда как в группе интактных животных он составлял  $58,00 \pm 10,58\%$ . Уровень содержания В-лимфоцитов в крови опытных животных достоверно не отличался от данных, полученных в группе интактных животных, и варьировал в пределах от  $8,00 \pm 2,00$  до  $16,75 \pm 2,50\%$ .

5. Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне молекулярных масс от 200 до 6,5 кДа, и вторичных метаболитов микобактерий *M.bovis* с диапазоном от 200 до 16,1 кДа. Установлено, что спектр полученных препаратов из экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8 и их вторичных метаболитов охватывает комплекс диагностически значимых антигенов, что исключает получение ложноотрицательных результатов при оценке специфического гуморального иммунитета при туберкулезе. С положительной сывороткой реагировали фракции антигена, полученного из вторичных метаболитов *M.bovis*

Vovinus-8, с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а антигенный материал из экстракта клеток был активен в зоне от 82,3 до 6,5 кДа.

6. Разработаны оптимальные условия и режимы постановки ИФА с использованием вторичных клеточных метаболитов и экстракта клеток *M.bovis*. При постановке ИФА с гипериммунной сывороткой кролика оптическая плотность достигала 3,203 ОЕ при использовании в качестве антигена вторичных клеточных метаболитов и была выше 3,500 ОЕ при использовании экстракта клеток.

7. Серологическими исследованиями установлено, что интоксикация хлоридом кадмия приводит к угнетению выработки специфических антител у кроликов при инфицировании *M.bovis*. Значения оптической плотности в ИФА достигали 0,947 и 0,221 ОЕ для указанных антигенов соответственно. Задержка в иммунном ответе составляла до 28-42 суток, при этом иммуноблотом выявлены антитела только к антигенным фракциям, локализованным в низкомолекулярной зоне.

8. При патоморфологическом анализе и гистологическом исследовании внутренних органов кроликов выявлены более выраженные морфофункциональные нарушения внутренних органов у животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации, вызванные как хроническим воздействием малых доз металла, так и течением инфекционного процесса. Так, массовый коэффициент селезенки был в 2 раза выше, чем в контрольной группе, обнаружили скопление лимфатических клеток с признаками распада. Печень по показателю массового коэффициента в экспериментальных группах была больше на 25-28%, чем у интактных животных, а гистоструктурные изменения в печени варьировали от набухания гепатоцитов до нарушения балочного строения.

9. Установлено, что хроническая кадмиевая интоксикация усугубляет патогенез туберкулеза у кроликов, выраженное в более высоком уровне индекса инфицированности *M.bovis*: 78% в группе инфицирования и 85% у животных, инфицированных на фоне хронической кадмиевой интоксикации. Фенотипически и генетически микобактерии, выделенные из органов инфицированных кроликов, в т.ч. и на фоне хронической интоксикации хлоридом кадмия, соответствовали контрольному штамму (исходная культура). Однако выявлено некоторое различие в полипептидном спектре, что требует дополнительных исследований.

10. Выявлена наибольшая кумуляция кадмия в почках и печени животных, инфицированных *M.bovis* на фоне хронической кадмиевой интоксикации,  $44,54 \pm 2,02$  мг/кг и  $14,72 \pm 3,5$  мг/кг соответственно, что превышало показатель у кроликов группы хронической интоксикации в 2-6 раз, а контрольной группы в 171-368 раз.

11. При анализе результатов ветеринарно-санитарной экспертизы выявлено несоответствие мяса и продуктов убоя кроликов при инфицировании *M.bovis* Vovinus-8, хронической интоксикации хлоридом кадмия и их сочетанном воздействии гигиеническим требованиям, предъявляемым к безопасности и качеству пищевых продуктов. В почках кроликов групп

хронической кадмиевой интоксикации выявлено превышение допустимого уровня кадмия для субпродуктов убойных животных в 40 раз, в печени – в 50 раз, в селезенке – 5-кратное превышение ПДУ, в мясе кроликов – в 2,5 раза.

### **Практические предложения**

Полученные результаты дополняют сведения, характеризующие закономерности воздействия кадмия на состояние здоровья, показатели естественной резистентности и специфического иммунитета животных, и могут быть использованы в научных исследованиях и учебном процессе при изучении вопросов влияния кадмиевой интоксикации на организм. Материалы диссертационной работы могут быть рекомендованы для использования в составлении научной литературы и образовательных ресурсов, в учебном процессе при проведении лекционных и практических занятий в профильных высших учебных заведениях.

Представленные результаты могут быть использованы ветеринарными специалистами для разработки мер профилактики и борьбы с туберкулезом сельскохозяйственных животных с учетом загрязнения агроценозов тяжелыми металлами. В диагностических целях рекомендуется использовать:

- способ получения антигена для выявления больных туберкулезом животных методами иммуноблота и ИФА: «Технологический регламент получения антигена из клеточной стенки *Mycobacterium bovis* Vovinus-8» (утвержден заместителем директора по НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 07.07.2016);

- способ получения высокоактивных сывороток крови кроликов к микобактериальным антигенам для использования в серологической диагностике туберкулеза: «Способ получения гипериммунной сыворотки к микобактериальным антигенам. Методические рекомендации» (одобрены научно-методическим советом ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», протокол №4 от 29.12.2016; утверждены директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 29.12.2016).

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### ***Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК***

**1.** Шуралев, Э.А. Мультиплексный ИФА с хемоллюминисцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, **А.Р. Валеева**, А.А. Васин, А.В. Иванов, С. Whelan // Ветеринария. – 2013. – № 2. – С. 25-28.

**2. Валеева, А.Р.** Патоморфологические изменения у кроликов при заражении *Mycobacterium bovis* на фоне хронической интоксикации тяжелыми металлами / **А.Р. Валеева**, В.А. Конюхова, Н.А. Хисматуллина, Р.М. Ахмадеев, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – №2. – С. 28-30.



- 3. Валеева, А.Р.** Влияние интоксикации кадмием на антителогенез кроликов при экспериментальном инфицировании *Mycobacterium bovis* / **А.Р. Валеева** // Ветеринарный врач. – 2016. – № 3. – С. 48-55.
- 4. Шуралев, Э.А.** Биохимические показатели сыворотки крови кроликов при туберкулезе на фоне интоксикации хлоридом кадмия / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, **А.Р. Валеева**, Р.М. Ахмадеев, З.З. Алеева, К.С. Хаертынов // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. – № 4(20). – С. 98-106.
- 5. Валеева, А.Р.** Гематологические показатели кроликов при туберкулезе и кадмиевой интоксикации / **А.Р. Валеева** // Аграрная наука – 2016. – № 8. – С. 27-29.

#### *Публикации в других изданиях*

- 6. Валеева, А.Р.** Изыскание эффективных средств лабораторной диагностики туберкулеза / **А.Р. Валеева** // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий: сборник трудов III межд. интернет-конф. / Редактор Изотова Е.Д. – Казань: «Казанский университет», 2013. – С. 78-79.
- 7. Шуралев, Э.А.** Рекомбинантные белки и синтетические пептиды для диагностики туберкулезной инфекции / Э.А. Шуралев, Н.А. Хисматуллина, М.Н. Мукминов, **А.Р. Валеева**, С. Whelan // Матер. IV Межд. Казанского инновационного нанотехнологического форума. – Казань: «Татарстанский ЦНТИ», 2012. – С. 287-289.
- 8. Валеева, А.Р.** Создание тест-систем для серодиагностики туберкулеза / **А.Р. Валеева** // Матер. IV Межд. Казанского инновационного нанотехнологического форума. – Казань: «Татарстанский ЦНТИ», 2012. – С. 442.
- 9. Шуралев, Э.А.** Перспективы применения мультиплексных иммуноаналитических тест-систем / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Н. Чернов, Г.Г. Казарян, **А.Р. Валеева**, Н.А. Хисматуллина // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК: матер. Межд. науч.-практ. конф. – Щелково, 2012. – С. 21-27.
- 10. Хисматуллина, Н.А.** Использование антигенов микобактерий *M.bovis* VCG-1, *M.bovis*-8 и *M.bovis* Vallee-88 для иммуноферментного анализа сывороток крови крупного рогатого скота / Н.А. Хисматуллина, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, А.Х. Найманов, Р.М. Ахмадеев, М.Н. Мукминов, **А.Р. Валеева** // Труды ВИЭВ. – 2013. –Т. 77. – С. 200-203.
- 11. Валеева, А.Р.** Культурально-морфологическая и электрофоретическая характеристика различных микобактерий / **А.Р. Валеева**, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, М.Н. Мукминов, Р.М. Ахмадеев // Окружающая среда и устойчивое развитие регионов Том I: Теория и методы изучения и охраны окружающей среды. Экологические основы природопользования / Под ред. проф. Латыповой В.З., проф. Ермолаева О.П., проф. Роговой Т.В., проф. Зариповой Ш.Х. – Казань: Изд-во «Отечество», 2013. – С. 50-52.

- 12.** Хисматуллина, Н.А. Использование комбинации антигенов из *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG и ППД при диагностике легочной формы туберкулеза иммуноблоттингом / Н.А. Хисматуллина, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, Р.М. Ахмадеев, Н.В. Волобуева, М.Н. Мукминов, **А.Р. Валеева**, А.В. Москвичева // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство: матер. II Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2014. – С. 135-138.
- 13.** Khismatullina, N. Preparation of mycobacterial antigens for serological diagnosis of tuberculosis / N. Khismatullina, K. Khaertynov, A. Ivanov, A. Gulyukin, T. Nevzorova, A. Gabdoulkhakova, A. Ivanov, **A. Valeeva**, M. Mukminov, E. Shuralev // BioTech 2014 & 6<sup>th</sup> Czech-Swiss Symposium with Exhibition. Prague, June 11-14, 2014. Book of Abstracts. – 2014. –P.166-167.
- 14. Валеева, А.Р.** Изучение серологической активности антигена с молекулярной массой в 45/47 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* / **А.Р. Валеева**, Н.А. Хисматуллина, А.П. Цибулькин, А.М. Гулюкин, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, Р.М. Ахмадеев, Т.А. Невзорова, К.С. Хаертынов, А.В. Москвичева, М.А. Нюхнин, А.К. Зыятдинова // IV Междунар. науч.-практ. конф. «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли». Матер.конф. / Под ред. Зыятдинова К.Ш. – Казань: ИД «Меддок», 2014. – С. 31-37.
- 15.** Хисматуллина, Н.А. Сравнительное изучение активности субъединичных антигенов в полном лизате *M.tuberculosis* H37RV и *M.bovis* Bovinus-8 в иммуноферментном анализе / Н.А. Хисматуллина, К.С. Хаертынов, Э.А. Шуралев, А.М. Гулюкин, М.Н. Мукминов, **А.Р. Валеева**, А.В. Москвичева // Биотехнология: реальность и перспективы: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Саратов: ИЦ «Наука», 2014. – С. 215-217.
- 16. Валеева, А.Р.** Некоторые физиологические и биохимические показатели кроликов при патогенезе туберкулеза на фоне интоксикации тяжелыми металлами / **А.Р. Валеева**, Р.М. Ахмадеев, З.З. Алеева // Актуальные направления инновационного развития животноводства и ветеринарной медицины: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2014. – С. 16-18.
- 17.** Шуралев, Э.А. Кадмий индуцированные изменения свойств микобактерий / Э.А. Шуралев, **А.Р. Валеева**, М.Н. Мукминов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2016. – Т.226, №2. – С. 177-181.

---

Подписано в печать . 2017. Форм. бум. 60×84 1/16.  
Усл.печ.л. 1. Тираж 100 экз. Заказ № .  
Отпечатано с готового оригинал – макета  
в типографии «Вестфалика»  
420111, г. Казань, ул. Московская, 22. Тел.: 292-98-92  
E-mail: westfalika@inbox.ru

---



