

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ КРОВИ МАРАЛОВ АЛТАЕ-САЯНСКОЙ ПОРОДЫ И ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОИММУННЫХ СЫВОРОТОК

*Бессонова Н.М., Деева В.С., Алисова Г.А., Петрусева Н.С., Заборских Е.Ю.,
Полтев А.В., Тунтешев Г.К., Челах В.А.*

В ходе опыта получены экспериментальные данные, на основании которых установлено, что разработанная методика по получению сывороток-реагентов и типированию групп крови маралов может применяться в практических целях, решится целый ряд вопросов, связанных со сложностями ведения селекционно-племенной работы в мараловодстве, главная из которых на сегодняшний день - отсутствие достоверных сведений о происхождении животных от определенных родителей.

Проблема изучения генофонда пород сельскохозяйственных животных с использованием маркерных признаков является одной из актуальных уже на протяжении более полувека. В её решении использовались различные методы: фенотипические, иммунобиохимические, цитологические, ДНК и др. Использование этих методик позволило выявить у сельскохозяйственных животных большое количество наследственных детерминант, синтез которых контролируется аллельными генами ряда генетических систем. Все выявленные таким образом наследственные детерминанты в определенной мере раскрывают сущность наших представлений о генофонде животных. Термин «генофонд» в литературу был введен А.С. Серебровским в 1926. Генофондом предложено было называть совокупность аллелей какой-либо группы организмов. Популяции, породы, стада, как отмечал А.С. Серебровский, а затем Тимофеев-Ресовский и др. (1969) отличаются не набором генов, а наличием разных систем аллелей при одном и том же числе генов. Поэтому более точно богатство внутривидовой изменчивости следует обозначать не термином «генофонд», а термином «аллелофонд». В изучении аллелофондов популяции сельскохозяйственных животных можно выделить три этапа: стихийный, сознательный и планомерный (или организованный).

Первый этап прошли все исследователи, которые в той или иной мере были связаны с вопросами изучения генетического полиморфизма. Это был начальный период стихийного накопления фактов. В те годы перед исследователями более остро стояли вопросы накопления реагентов и их международной унификации. Начало второго этапа совпадает с периодом, когда отдельные группы исследователей накопили достаточное количество материала об аллелофондах исследованных пород и возникла потребность в его обобщении. Для этого этапа характерны работы многочисленных исследователей как за рубежом, так и в нашей стране. Третий планомерный или организованный этап начался с момента разработки в 1979 году в Институте общей генетики и ИЭМЭЖ им. А.Н. Северцова АН СССР проекта: «Учет аллелофонда популяций сельскохозяйственных животных и птиц по маркерным генам» (ВНТИцентр, инв. № Б 925432, 1980). Последующие экспедиционные обследования поголовья крупного рогатого скота, включая и уникальные породы, позволили познать фонды антигенов и аллелей по ряду систем групп крови и полиморфных белков.

С 90-х годов locus получил новое обозначение: EAB-locus. По последней номенклатуре аббревиатура локуса расшифровывается следующим образом: E — эритроцит, A — антиген В-локуса. Этот locus интересен тем, что антигенные факторы, контролируемые им, наследуются, в основном, сцеплено неделимыми блоками (аллелями). Их число в породах колеблется от 15-20 до 100 и более. Они позволяют маркировать отдельные участки или целые хромосомы конкретных животных. Именно благодаря этому locus удалось расшифровать многие ранее неизвестные тайны селекционного процесса, воочию убедиться в справедливости хромосомной теории наследственности. В-locus находится на 29 хромосоме, контролирует 36 антигенных факторов и входит в состав 12 группы сцепления и 27 синтенной группы. Анализ крови отдельных особей показал: 1) обнаруженные в раннем возрасте антигены сохраняются на протяжении всей жизни без изменения; 2) характер комбинации (сочетания) антигенов у каждого животного строго индивидуален (специфичен) (Н.О. Сухова; В.С. Деева, 1980).

В последние годы сведения о генетических системах крови аборигенного скота привлекают не только при выяснении происхождения современных пород, но и истории формирования отдельных этносов человеческих сообществ. (А.А. Dunlop, 1951).

Имуногенетиков многие годы интересовала возможность установления связи генотипических характеристик животных по группам крови и белковым полиморфным признакам

с предрасположенностью животных к тем или иным заболеваниям: лейкозу, маститу, пироплазмозу, стрессу и др. (Л.К. Эрнест, Н.Г. Дмитриев, А.И. Жигачев, 1979; Л.К. Эрнест, В.П. Шашков, 1984; Larsen B., Jensen N.E., Madsen P. et al, 1985).

В последние годы широко изучается связь групп крови с хозяйственно-полезными признаками (П.Ф. Сорокова, 1966; В.Н. Тихонов, 1967; В.А. Бусол; В.Я. Мещеряков, 1970; Н.О. Сухова, 1972; В.С. Деева, 1986; И.И. Клименок, 1998 и др.). Успешно изучается связь групп крови с устойчивостью животных к заболеваниям, а также при анализе несовместимости по группам крови, (Т.Я. Ыква, 1974; В.С. Деева, Н.О. Сухова, 2002.).

Иммуногенетический анализ, связанный с полиморфизмом по группам крови, можно проводить, только располагая моноспецифическими антисыворотками (реагентами), содержащими антитела против каждого изучаемого антигенного фактора. При наличии антисывороток определение антигенов является несложным и делается легко осуществимым в практических условиях. Однако изготовление реагентов очень трудоемкий, сложный и длительный процесс (В.Н. Тихонов, 1966; И.Г. Горелов, 1975; И.О. Сухова, 1985). Важной проблемой в пантовом оленеводстве является изучение функциональных, морфологических и антигенных свойств крови - групп крови.

Цель исследования. Получение изоиммунных сывороток для выявления фенотипа и генотипа по группам крови маралов и изучение функциональных, морфологических, антигенных свойств крови у маралов Алтае-Саянской породы в постнатальном онтогенезе. Одной из главных задач селекционно-племенной работы заключается в изучении генетических особенностей совершенствуемых животных.

Методика постановки проверки. Научно-исследовательские работы в 2009 г. проведены на территории Центрального Алтая на базе СПК «Абайский» Усть-Коксинского района. Подобраны в опытную группу по 25-30 голов. Один донор закреплен за 3-5 реципиентами. Он должен иметь от I до 4-5 антигенных факторов, отсутствующих в крови реципиента. При изоиммунизации обычно практикуется внутримышечное введение антигена в целях предотвращения анафилактической реакции, которая может быть от внутривенных введений чужеродной крови.

Схемой иммунизации обычно предусматриваются трехкратные инъекции антигена с семидневными интервалами. Дозы антигена (50% взвесь эритроцитов) - 20 мл для марала. Перед заключительной инъекцией антигена от реципиента берется кровь в объеме 10-15 т для проверки активности сыворотки. Если титр иммунных антител не ниже 1/4-1/8 на 7-8-й день после третьего введения антигена, от реципиентов берется кровь на изготовление сывороток. Одновременно проведен качественный и количественный анализ крови .

Результаты исследований. Иммуногенетический анализ получил широкое распространение при паспортизации племенных животных, контроле записи происхождения молодняка и оценке производителей по потомству. Не меньше его значение при выявлении направленности селекционных процессов, а также при выяснении генетических особенностей отдельных животных или выявлении корней происхождения, генетического сходства пород, породных групп, линий, семейств, отдельных родственных групп. Все это не только способствует повышению уровня селекционной работы, но существенно меняет ее методы. Нельзя сбрасывать со счета возможности привлечения сведений о группах крови в теоретической разработке основ крупномасштабной селекции.

Для того чтобы паспортизовать животное по группам крови, нужно осуществить серологическое реагирование его эритроцитов с набором антисывороток, специфичных к антигенным факторам всех известных систем крови. Поскольку большинство лабораторий в своем банке не имеют антисывороток, специфичных ко всем известным антигенам, паспортизация ведется с привлечением 60-70 антисывороток.

Реакция гемолиза выполняется в объеме четырех капель: две капли специфической сыворотки (реагента), нативного или разбавленного физиологическим раствором до рабочего титра, капля - 2-1,5 взвеси отмытых эритроцитов анализируемых животных и капля комплемента. Вначале по лункам разносятся антисыворотки, затем закапывается эритроцитарная взвесь и после 15-минутного выдерживания внесенных компонентов при комнатной температуре (18-20 °С). Рабочий титр реагента обычно устанавливают на один порядок ниже титра, выявленного в серии двукратных разведений при его проверке или указанного на этикетке (если он серийного изготовления). Например, титр реагента, выявленный в серологическом анализе, 1/32, рабочий - 1/16.

Для постановки реакции гемолиза используют пластины с луночками. Каждая пластина маркируется, снабжается порядковым номером, который пишется на кусочке лейкопластыря и наклеивается в нижний левый угол пластины. При расчете численности необходимых пластин для постановки реакции учитывается соответствие их горизонтальных рядов количеству используемых тест-сывороток, а вертикальных - численности проб крови анализируемых животных. Последние два горизонтальных ряда отводятся под контроль эритроцитов. Первый вместо антисыворотки содержит физиологический раствор и позволяет судить об отсутствии неспецифического лизиса эритроцитов. Во второй внесены физиологический раствор, эритроциты. Этот ряд вводится для того, чтобы проконтролировать наличие в комплементе естественных гемолизин или гемагглютининов, которых комплемент не должен содержать.

Инкубация реакции с эритроцитами осуществляется в течение 3,5-4 ч в термостате при 36 °С. После выдерживания реакции в течение первых 30 мин пластины встряхивают и оставляют в термостате еще на 1,5-2,0 ч. По истечении этого времени регистрируется интенсивность реакции в протоколе. Затем пластины встряхивают и инкубация продолжается в течение следующих 2 ч, после чего реакция учитывается повторно. Результаты ее вносят в протокол чернилами другого цвета в отличие от первоначальной записи. Это обеспечивает учет реакции в динамике.

Если какая-либо сыворотка положительно реагирует с эритроцитами всех анализируемых животных только к повторному учету, это указывает на ее слабость и необходимость пересмотра рабочего титра. Нормально реагирующие сыворотки могут проявлять неодинаковые по скорости реакции с эритроцитами отдельных животных. Наибольшее влияние оказывает эффект "дозы". Более сильное реагирование отмечается у тех животных, которые гомозиготны по аллелю, детерминирующему тот или другой антиген.

Реакцию оценивают по четырех балльной системе:

4 - полное растворение внесенных эритроцитов, лизат прозрачен;

3 - эритроциты растворены, на дне лунок слабые следы осадка, при встряхивании пластин отмечается небольшое помутнение лизата;

2 - сыворотка умеренно окрашена, на дне лунок осадок эритроцитов;

1 - чуть заметное окрашивание сыворотки, на дне лунок осадок эритроцитов, почти равный осадку контрольных лунок. Отсутствие реакции отмечается точкой (.). Реагенты при паспортизации животных используются в соответствии с последовательностью известных антигенов генетической системы крови A1; A2; D; H; Z'; B1; B2 ; G. Пробы крови на иммуногенетический анализ отбирают в хорошо закрывающиеся (пробками) пробирки, флаконы или капельницы. В целях предотвращения образования сгустков крови в них заранее вносится антикоагуляционный раствор из расчета 1/3-1/4 объема вносимой крови.

Изоиммунизация обычно проводится на животных, которые тестированы по возможно большему числу антигенных факторов из числа выявленных к настоящему времени (30 голов). При изоиммунизации обычно практикуется внутримышечное введение антигена в целях предотвращения анафилактической реакции, которая может быть от внутривенных введений чужеродной крови. После переливания крови, в сыворотке маралух, спустя 5—6 дней появлялись антитела, способствующие развитию острого внутрисосудистого разрушения крови.

Прижизненное извлечение крови позволяет от взрослого донора получить от 0,5 до 2,5 л в зависимости от физиологического состояния животного. Для отбора крови заготавливают посуду с вакуумом (донорские флакона, бутылки).

Отслаивание сыворотки осуществляли общепринятым способом. Вначале кровь выдерживают при температуре 36-37 °С (в течение 1-2 ч). Затем сгустки с отделяющейся сывороткой сохраняются в течение 16-18 ч в холодильнике (+4 °С). По истечении этого времени сыворотку сливали, взвешенные в ней эритроциты, кусочки фибрина отделяли центрифугированием (при 3- 3,5 тыс.об/мин в течение 7-10 мин). Слитую сыворотку инактивируют на водяной бане при 56 °С в течение 30 мин. После этого сыворотку разливали в полиэтиленовую посуду, добавляли консервант (0,2% мартиолята или 1,5% борной кислоты) и хранили при -20 °С. Сыворотки, полученные в результате изоиммунизации или гетероиммунизации, называются "сырыми". Они редко содержат антитела одной какой-либо специфичности. Обычно в них имеется несколько антител, специфичных к различным антигенам.

При изготовлении монорецепторных сывороток, способных реагировать с эритроцитами (склеивать их или растворять) за счет соединения с каким-либо одним антигеном, ведется техническая обработка "сырых" сывороток. В результате этого в сыворотке остается одно

антитело, получение которого запланировано. Нежелательные антитела извлекаются из сыворотки добавлением к ней эритроцитов животного, имеющего антигены, комплементарные удаляемым антителам.

Если в крови выбранного для абсорбции животного нет на эритроцитах всех антигенов, антитела к которым необходимо вывести из "сырой" сыворотки, то можно использовать кровь нескольких животных (одновременно или последовательно). Эритроцитарную массу добавляют после предварительного трехкратного промывания ее шести-, восьмикратным объемом физиологического раствора. После каждого промывания эритроциты осаждают центрифугированием (5-6 мин при 3-3,5 тыс.об/с), а надосадочная жидкость удаляется. Эритроцитарная взвесь в зависимости от активности "сырых" сывороток добавляется в неодинаковом количестве от 1/2 до одного объема взятой сыворотки. При недостаточной абсорбции сывороток операция повторяется. Число иммунореактивных животных в каждой серии при обычных иммунизациях (без использования адъювантов) составляло от 50 до 60%. В результате каждой серии иммунизации обычно удавалось получить 10-12 иммунных "сырых" сывороток, содержащих различные антитела, которые часто отличались по титру. Для того, чтобы из таких "сырых" сывороток получить какой-либо моноспецифический реагент, мы или проводили инактивацию слабых антител разведением, или чаще абсорбировали все антитела, кроме нужных нам эритроцитами с известным антигенным составом. После каждой-анализирующей абсорбции обязательно проводили конфрантации сыворотки со стандартной "панелью" - набором эритроцитов известного антигенного состава от 20-30 животных.

Получение моноспецифических сывороток-реагентов для изучения эритроцитарного полиморфизма у маралов - трудоемкий и длительный процесс.

Морфологические и биохимические показатели состава крови контрольной и опытных групп, как установлено, не имели статистически достоверных различий. Количество эритроцитов у взрослых маралух в зимний период составили $7,75 \pm 0,05$ млн/ мкл. Показатель гетерогенности эритроцитов очень высок $42,71 \pm 0,06\%$. В эритроцитах отмечена повышенная концентрация гемоглобина $182,3 \pm 0,11$ г/л, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах $361,7 \pm 0,05$ г/л. У молодых маралух в возрасте от 3-7 лет показатели выше, чем у старых на 3%. Показатель гематокрита, который выражается в процентах, составил у маралух $44,1 \pm 0,30\%$. Моноциты 3,6% - самые большие клетки крови, обладают активным фагоцитозом. Гранулоциты 37,6% представлены базофилами, эозинофилами и нейтрофилами. В зимние время у молодых маралух эозинофилов был выше на 1,5%, палочкоядерных нейтрофилов ниже на 0,6% по сравнению с летним периодом. Агглютиногены эритроцитов и резус-фактор образуются в период эмбрионального развития, поэтому группы крови не меняются в течение всей жизни.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что все морфобиохимические показатели крови полностью отражали специфическую характеристику состояния животных, все изучаемые показатели крови и ее сыворотки во время опыта соответствовали физиологической норме. На основании полученных результатов в дальнейшем будет определен генетический потенциал и паспортизация животных алтайской популяции маралов и реализованы межотраслевые комплексные зоотехнические приемы пантового производства. Полученные сыворотки будут использованы для дальнейшего анализа происхождения.

Литература

1. *Бусол В. А., Мецераков В.Я.* О взаимосвязи групп крови и полиморфизма белков с резистентностью крупного рогатого скота к лейкозу // *Материалы 16 Авдунар. конф. по группам крови и биохим. полиморфизму животных.* – Л., 1979. – С. 37-39.
2. *Горелов И.Г.* Изучение иммуногенетического полиморфизма по группам крови у свиней разных пород. Автореферат дис. на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук. – Новосибирск, 1975. – 18с.
3. *Деева В.С.* Характеристика сибирского черно-пестрого скота по антигенным свойствам крови и использование ее в селекции // Автореф. дис. канд. с.-х. наук. – Новосибирск, 1986. – 20 с.
4. *Деева В.С., Сухова Н.О.* Группы крови крупного рогатого скота и их селекционное значение. / РАСХН. Сиб. Отд-ние. СибНИПТИЖ. – Новосибирск, 2002. – 172 с.
5. *Клименок И.И. и др.* Высокопродуктивный тип сибирского черно-пестрого скота / И.И. Клименок, И.М. Лабузова, Л.Д. Герасимчук и др. // *Проблемы АПК в условиях рыночной экономики: Тез. докл. юбил. регион, науч.-практ. конф.* – Новосибирск, 1996. – С. 106.
6. *Сухова И.О.* Иммунобиологические механизмы и их значение в повышении продуктивности животных: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 1972. – 39 с.
7. *Сухова Н.О., Деева В.С.* Контроль правильности записи происхождения племенного молодняка с использованием иммуногенетических методов // *Выращивание племенного и свёрхремонтного молодняка сельскохозяйственных животных в Сибири: Сб. науч. тр. / ВАХНИЛ. Сиб. отд-ние. СибНИПТИЖ.* – Новосибирск, 1980. – С. 35-39.
8. *Сухова Н.О.* Роль иммуногенетических исследований в повышении продуктивности животноводства // *Роль науки в реализации продовольственной программы СССР.* – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1985. – С. 167-176.
9. *Сороковой П.Ф.* Применение групп крови крупного рогатого скота в племенной работе // *Вопросы генетики и разведения с.-х. животных.* – Дубровицы, 1966. – С. 17-19.
10. *Тихонов В.Н.* Генетические системы групп крови животных. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1966. – 116 с.
11. *Тихонов В.Н.* Использование групп крови при селекции животных. – М.: Колос, 1967. – 390 с.
12. *Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Жигачев А.И.* Современные проблемы селекции животных и резистентность к болезням // *Сельскохозяйственная биология.* – 1979. – Т. 14, № 3. – С. 345-347.
13. *Эрнст Л.К., Шашков В.П.* Новые аспекты селекции крупного рогатого скота на устойчивость к лейкозу // *Там же.* – 1984. – № 2. – С. 96-103.
14. *Блва Т.Я.* Характеристика антигенного состава эритроцитов крупного рогатого скота некоторых линий быков красной эстонской породы в связи с лейкозом // *Использование генетических параметров и методов в селекции сельскохозяйственных животных.* – Жодино, 1974. – С. 184.
15. *Dunlop A.A.* Type differences in blood antigens in a Guernsey herd // *J. Dairy Sci.* – 1951. – №34. – P. 156-166.
16. *Larsen B., Jensen N.E., Madsen P. et al.* Association of the M blood group system with bovine mastitis // *Anim blood groups Biochein. Genet.* – 1985. – № 16. – P. 165.

CHARACTRISTICS OF ANTIGENE BLOOD PROPERTIES OF MARALS OF ALTAI-SAYANSK BREED AND RECEPTION OF ISOIMMUNE WHEY

Bessonova N.M., Deeva V.S., Alisova G.A., Petrusheva N.S., Zaborsky E.JU., Poltev A.V., Tunteshv G.K., Chelah V.A.

Basing on the experimental data received during the experience there was established that the developed technique on reception of whey-reagents and determining of blood types of Siberian stags can be applied in the practical purposes. Moreover, the number of questions connected with complexities of conducting of selection and pedigree work in maral - breeding, main of which for today is absence of authentic data on the origin of animals from certain parents, will be solved.