

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2018. - №1 (96). - С.96-104

МИКРОБИОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСОВОЙ ПОЛОСТИ ЖЕРЕБЕНКА

*Кухар Е.В., Даугалиева С.Т.,
Даугалиева А.Т.*

Аннотация

В статье представлены результаты исследований микробиома носовой полости жеребенка. Микробиом регулирует многие жизненно важные процессы организма. Его изучение необходимо для детального понимания процессов, происходящих между микроорганизмами, населяющими определенный орган, и их взаимосвязью с клетками организма.

Традиционно микробная популяция изучается посредством техники культивирования, проведения физико-химических и биохимических тестов. Данные методы трудоемки, занимают много времени, требуют предварительных знаний об интересующих микроорганизмах для их выделения из сообщества, а также не так точны, как идентификация генотипическими методами.

Всестороннее изучение состава микробиома отдельных органов и тканей организмов стало возможно с появлением новых молекулярно-генетических методов, в частности NGS-секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing).

С помощью новой технологии NGS-секвенирования на платформе MiSeq Illumina был проведен анализ ДНК, полученной непосредственно из смыва, без стадии культивирования на питательных средах. Была проведена генетическая идентификация всех присутствующих бактерий, в том числе и некультивируемых форм.

Генетический анализ показал, что микробиома носа жеребца состояла из следующего типа: *Firmicutes* (73,42%), актинобактерии (8,36%), протеобактерии (8,33%), цианобактерии (6,69%), бактериодеты (1,55 %) и фузобактерии (0,75 %). Доминирующими видами в сообществе были *Lactobacillus equi* (12,09%). Изучение микробного сообщества органов и тканей животных поможет понять механизм их взаимодействия между собой

и макроорганизмом, нормальным и патологическим. Знание этих процессов будет полезно при разработке лекарств для лечения и профилактики болезней животных.

Ключевые слова: микробиом, секвенирование, Illumina MiSeq, NGS, ген 16S rRNA, ДНК, таксон, микрофлора.

Введение

Изучение микроорганизмов на молекулярном уровне открыло перед учеными новые возможности изучения микрофлоры органов и тканей животного. Сегодня считается устаревшим термин «микрофлора», на замену ему приходит более широкое понятие под названием «микробиом». Микробиом представляет собой сообщество бактерий, которое каждый организм имеет внутри и снаружи своего тела. Для каждого индивида он является уникальным и содержит в десятки раз больше клеток и генов, чем собственных генов организма.

Микробиом регулирует многие жизненно важные процессы организма. Его изучение необходимо для детального понимания процессов, происходящих между микроорганизмами, населяющими определенный орган, и их взаимосвязью с клетками организма.

Микробные сообщества, населяющие организм животных, оказывают большое влияние на физиологические функции

макроорганизма. Анализ филогенетической структуры микробиомов различных органов и тканей необходим для оценки состояния здоровья животного. Альтернативным методом точного определения микробного разнообразия в различных объектах в последние годы стало секвенирование ДНК микроорганизмов. Открытие методов секвенирования нового поколения (NGS технологии) позволяет получить последовательности генов каждого микроорганизма сообщества.

Для точной и достоверной идентификации микроорганизмов наиболее лучшим методом является использование метагеномного анализа.

Метагеномика - раздел молекулярной генетики, в котором изучается генетический материал, полученный из образцов окружающей среды. Метагеномика изучает набор генов всех микроорганизмов, находящихся в образце среды – *метагеном*, что позволяет определить видовое

разнообразие исследуемого образца без необходимости выделения и культивирования микроорганизмов. Объектами изучения метагеномики могут являться любые популяции микроорганизмов, обитающих в воде, почве, организме животного, человека или любой другой среде. Основным преимуществом использования метагеномного подхода является учёт не только культивируемых микроорганизмов, но и некультивируемых.

Метагеномика позволяет детально изучить разнообразие сообществ, а значит, и выяснить механизмы их функционирования, определить метаболические взаимосвязи.

Метагеномный подход в науке стал возможен благодаря развитию высокопроизводительного секвенирования – современных технологий «прочитывания» нуклеотидной последовательности ДНК, позволяющих анализировать крупные объёмы генетической информации.

Наиболее популярен в метагеномных исследованиях анализ гена 16S рРНК, на строении которого основана современная филогенетическая классификация прокариотических организмов.

Традиционно микробная популяция изучается посредством техники культивирования,

проведения физиологических и биохимических тестов. Данные методы трудоемки, занимают много времени, требуют предварительных знаний об интересующих микроорганизмах для их выделения из сообщества, а также не так точны, как идентификация генотипическими методами [1]. Кроме того, классические методы не позволяют полностью идентифицировать все микроорганизмы из-за присутствия так называемых «некультивируемых форм».

Исследования последних лет показали, что традиционными микробиологическими методами удается идентифицировать менее 1% от общего числа бактерий в образце, остальные 99% не поддаются культивированию на стандартных микробиологических средах [1, 2, 3]. «Некультивируемые» бактерии невозможно вырастить в лабораторных условиях, так как для их роста нет подходящих условий, какие были в окружающей их среде (питательные вещества, рН, осмотические условия, температурные и многие другие факторы). В «некультивируемое состояние» (НС) или в состояние покоя, характеризующееся резко сниженной метаболической активностью и временной потерей способности к размножению, бактерии способны переходить в

ответ на стрессовые условия окружающей среды.

Всестороннее изучение состава микробиома отдельных органов и тканей организмов стало возможно с появлением новых молекулярно-генетических методов, в частности NGS-секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing). Исследование метагеномного состава бактерий по этой методике проводится без стадии культивирования, то есть, из образца напрямую выделяется вся геномная ДНК, которая и подвергается секвенированию.

В отличие от классического секвенирования по Сенгеру (1977) [4] NGS-платформы позволяют прочитывать миллионы небольших фрагментов ДНК параллельно с двух сторон, в результате чего получается огромное количество данных [5]. За один запуск NGS-секвенирование способно определять от нескольких десятков тысяч, до нескольких миллиардов нуклеотидов в зависимости от поставленных задач [6].

Использование NGS-технологии в последние годы является активно развивающимся направлением в науке для изучения человеческого микробиома. Исследования человеческой микробиологической флоры проводятся в рамках проекта «Human Microbiome» с целью определения роли «микробиома» во взаимодействии с человеческим

геномом [7]. Уже доказано, что микробиом людей играет важную роль для здоровья и процессов старения человека.

Несмотря на то, что изучение микробиома животных, в частности лошадей, еще не так развито, исследования в этом направлении активно ведутся [8]. Так Wenling Gao (2016) с соавторами определили в субгингивальном пространстве ротовой полости здоровых лошадей 12 разновидностей бактериальных филлов: *Actinobacteria* (3.17%), *Bacteroidetes* (25.11%), *Chloroflexi* (0.04%), *Firmicutes* (27.57%), *Fusobacteria* (5.15%), *Proteobacteria* (37.67%), *Spirochaetes* (0.15%), *Synergistetes* (0.22%), *Tenericutes* (0.16%), GN02 (0.19%), SR1 (0.01%) and TM7 (0.37%). При этом авторы обнаружили, что микробиота поддесневого пространства лошадей имеет много общего с человеческими, собачьими и кошачьими микробами [9].

Установлено, что в слизистой оболочке желудка лошадей доминируют следующие микроорганизмы: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, состоящие из *Actinobacillus* spp., *Moraxella* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Helicobacter* spp. [10]. В тонком кишечнике лошадей также преобладают *Firmicutes*, однако при патологических процессах состав микробиома изменяется [11].

Состав фекального микробиома может стать одним из критериев диагностики заболеваний. Так по

данным Marcio C. Costa (2012) с соавторами в фекалиях здоровых лошадей преобладали *Firmicutes* (68%), далее следовали *Bacteroidetes* (14%) и *Proteobacteria* (10%). А у лошадей, больных колитом, наоборот, наиболее многочисленными были *Bacteroidetes* (40%), представителей *Firmicutes* было меньше (30%), количество *Proteobacteria* составило 18% [12].

Материалы и методика исследований

Для исследования были взяты смывы из носовой полости жеребенка. ДНК из смывов выделяли с помощью набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США). Концентрацию ДНК определяли на флуориметре Quibit 2.0 (Invitrogen, США). Качество библиотек ДНК оценивали по показаниям биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). Очистку ПЦР-продукта проводили с использованием реагента AGENCOURT® AMPURE® XP Beads (Beckman Coulter, США) на магнитном штативе.

16S метагеномное секвенирование проводили на полногеномном секвенаторе нового поколения MiSeq (Illumina, США) в молекулярно-генетической лаборатории РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК. ДНК-библиотеки (совокупность фрагментов

Таким образом, изучение микробиома животных является наиболее современным и перспективным направлением в биологической и в ветеринарной науке. В настоящее время возможность проведения подобных исследований появилась и у нас в Казахстане на базе отечественных лабораторий, оснащенных NGS-платформами последнего поколения.

исследуемого образца ДНК) готовили согласно инструкции 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США).

В работе были использованы универсальные праймеры к v3 и v4 регионам 16S rRNA гена, содержащие кроме ген-специфической последовательности, специальные адаптеры Illumina:

- 16S Amplicon PCR Forward Primer:

```
5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTG  
TATAAGAGACAGCCTACGGGNG  
GCWGCAG
```

- 16S Amplicon PCR Reverse Primer:

```
5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT  
GTATAAGAGACAGGACTACHVG  
GGTATCTAATCC.
```

Библиотеки готовили в несколько этапов: получение ПЦР-продукта с универсальными праймерами,

оценка его качества и количества, очистка, присоединение индексов Illumina в ПЦР шаге, очистка, оценка качества и количества продукта с индексами, нормализация, объединение, денатурация библиотек. Далее общий пул образцов соединяли с rNix контролем. Секвенирование проводили с использованием набора Kit v2 (500 циклов) (Illumina, США).

Полученные библиотеки вносили в картридж набора для секвенирования, загружали картридж и проточную ячейку в прибор. Запускали программу секвенирования на приборе. Обработку результатов секвенирования проводили с помощью программы MiSeq Reporter.

Основные результаты исследований НИР

В процессе пробоподготовки были получены фрагменты ДНК с индексами для секвенирования на приборе MiSeq Illumina. Количественные и качественные

показатели полученных библиотек соответствовали необходимым требованиям (рисунок 1).

Были получены ампликоны участков 16S rRNA гена.

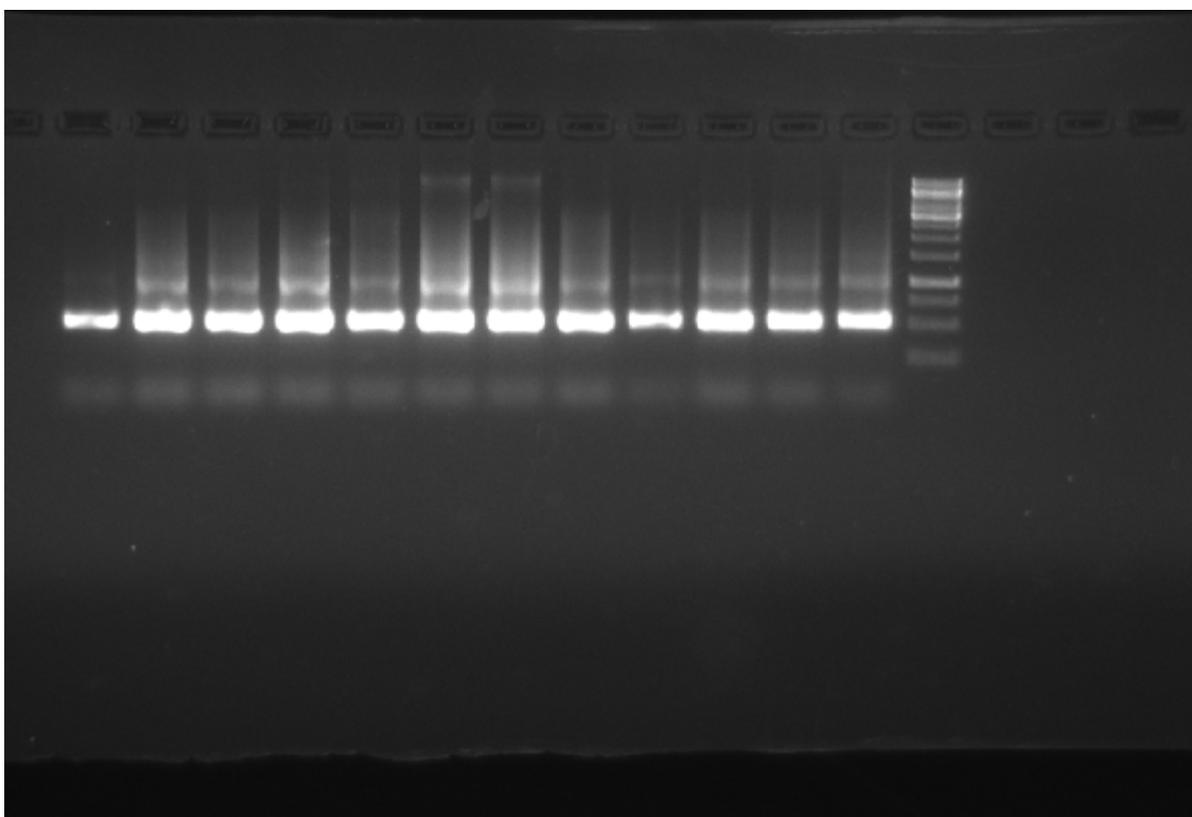


Рисунок 1 – Фрагменты ДНК, полученные с праймерами к участкам 16S rRNA гена

В качестве ДНК маркера был использован GeneRuler 1 kb DNA Ladder_(Thermo Scientific). Как видно из рисунка 1, размер ампликонов составил 550 п.н. Далее к полученным ампликонам были пришиты специальные

адаптеры Illumina. Оценку качества библиотек проводили на биоанализаторе Ajilent 2100 (рисунок 2).

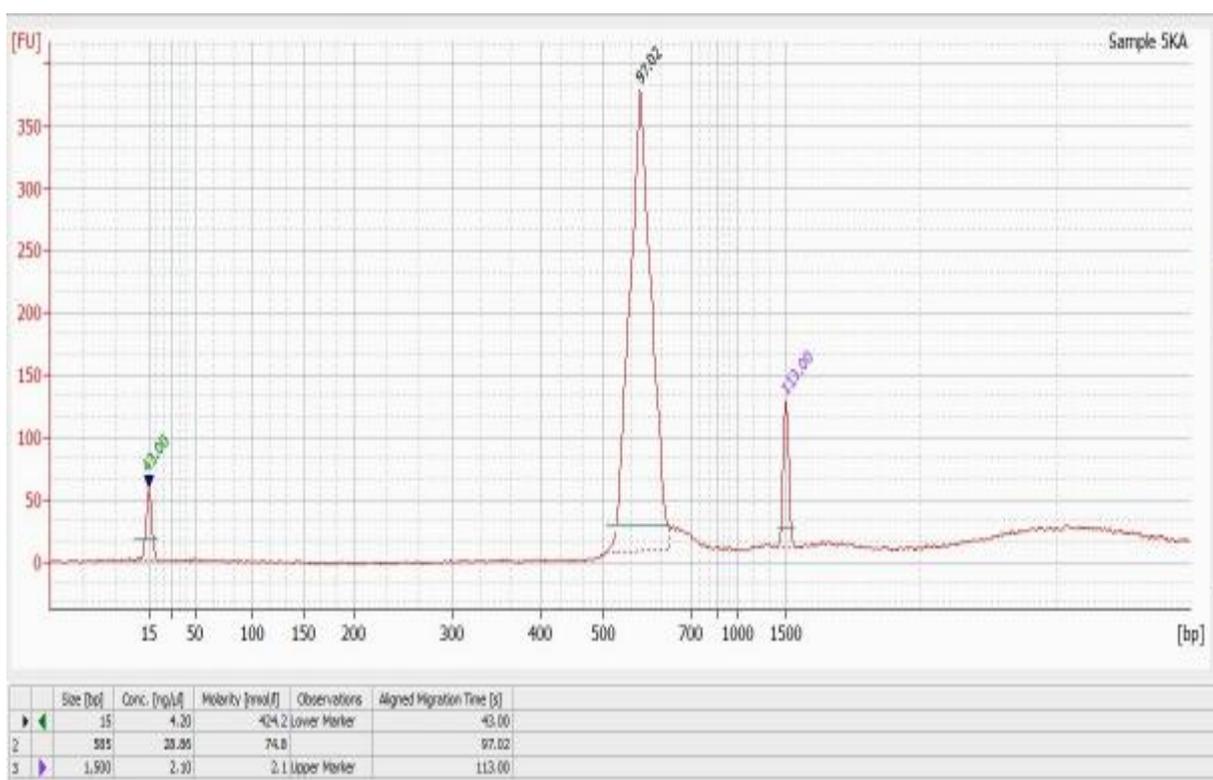


Рисунок 2 – Фрагменты ДНК с индексами по показаниям биоанализатора Agilent 2100

Как видно из рисунка 2, размер библиотек данного образца составил около 600 п.н., концентрация – 28,86 нг/мкл.

Единичный пик свидетельствует о чистоте продукта. Полученные фрагменты 16S rRNA гена секвенировали на платформе

MiSeq Illumina. Прибор позволяет проводить гибридизацию образцов на чипе, амплификацию, секвенирование и обработку результатов в одном пробеге. В результате проведенного анализа было получено всего 602,748 ридов (коротких прочтений ДНК).

Количество ридов, прошедших через качественный фильтр, составило 602,748 или 100%. Показатель качества секвенирования (Quality Scores) составил $Q > 30$, вероятность ошибки 0.001 (1 на 1000) или 99,9% достоверности, что свидетельствует о высоком качестве анализа.

В результате таксономической классификации 99,89% микроорганизмов в образце были идентифицированы как

относящиеся к царству бактерий и 0,11% к другим царствам, в том числе 0,01% к вирусам.

В результате разделения идентифицированных бактерий на типы было установлено следующее соотношение: *Firmicutes* (73,42%), *Actinobacteria* (8,36%), *Proteobacteria* (8,33%), *Cyanobacteria* (6,69%), *Bacteroidetes* (1,55%) и *Fusobacteria* (0,75%).

На уровне класса была идентифицирована 51 таксономическая единица, на уровне порядка – 104. Классификация на уровне семейства определила 231 таксономическую единицу бактерий (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты классификации до семейства

№	Классификация	Число ридов	Процент от общего числа ридов
1	<i>Lactobacillaceae</i>	194,410	32,25 %
2	<i>Streptococcaceae</i>	111,210	18,45 %
3	<i>Gemellaceae</i>	106,137	17,61 %
4	<i>Rivulariaceae</i>	36,290	6,02 %
5	<i>Bifidobacteriaceae</i>	31,497	5,23 %
6	<i>Neisseriaceae</i>	23,773	3,94 %

7	<i>Unclassified at Family level</i>	17,182	2,85 %
8	<i>Micrococcaceae</i>	12,492	2,07 %

В таблице 1 приведены названия 8 семейств, имеющих наибольший процент из 231 таксономической единицы бактерий, идентифицированных на уровне класса. Доминирующим семейством стало *Lactobacillaceae* – 32,25%.

Результаты анализа, проведенного на приборе MiSeq, выдаются в виде паспорта пробега от компании Illumina (таблица 2).

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
602,748	602,748	100.00%

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	602,135	99.90%
Phylum	598,606	99.31%
Class	593,905	98.53%
Order	590,046	97.89%
Family	585,566	97.15%
Genus	575,282	95.44%
Species	413,356	68.58%

Данные о качестве анализа и результатах, приведенные в паспорте пробега были вычислены с помощью специального

программного обеспечения на сайте компании Illumina. Как видно из таблицы 2, классификация бактериального сообщества в образце была проведена на 99,9%.

Классификация на уровне рода приведена на рисунке 3.

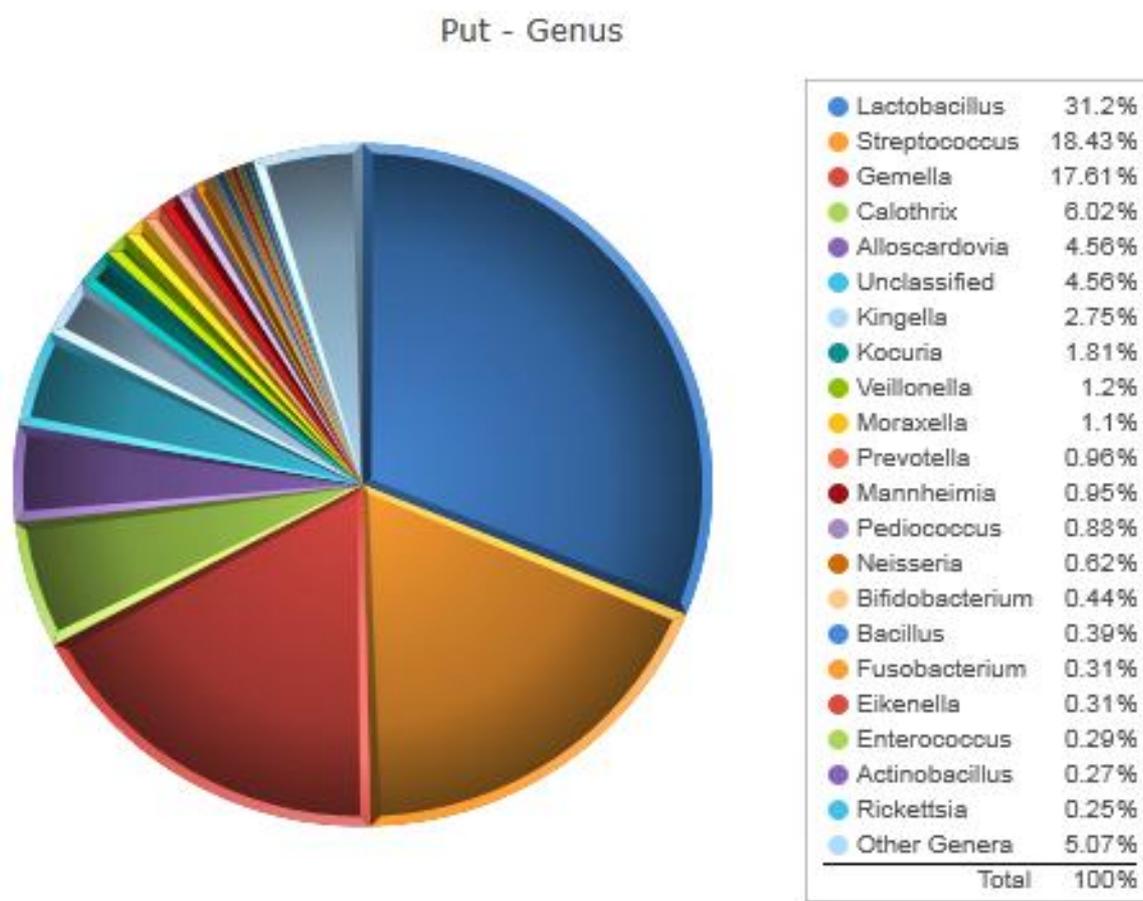


Рисунок 3 – Результаты идентификации микробного состава микробиома смыва из носовой полости жеребенка на уровне рода

Как видно из рисунка 3, доминирующими родами являются: *Lactobacillus* (31,2%), *Streptococcus* (18,43%) и *Gemella* (17,61%).

Классификация на уровне вида позволяет определить микроорганизмы, имеющие различия в вариабельных регионах 16S rRNA гена, в то время как близкородственные

микроорганизмы определяются только до рода. В связи с этим классификация бактерий до вида менее информативна. Раздел «Other» отражает процент не идентифицированных до вида бактерий (рисунок 4).

Top Species Classification Results

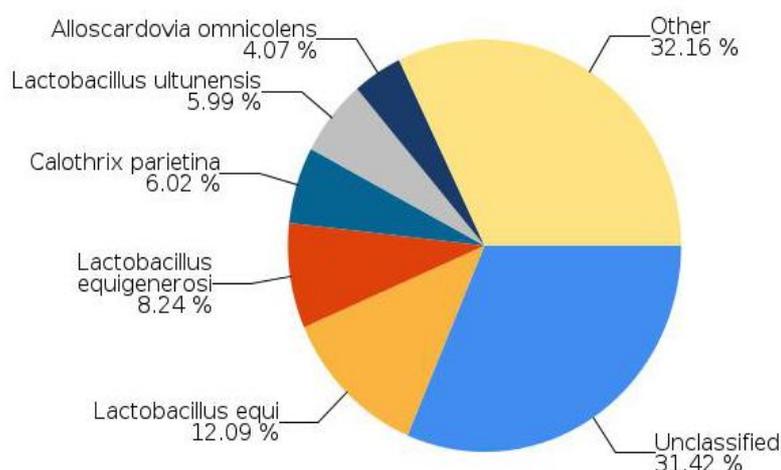


Рисунок 4 – Результаты классификации микробного состава микробиома смыва из носовой полости жеребенка до вида

Из рисунка 4 видно, что из общего числа идентифицированных до вида микроорганизмов, наибольший процент составил вид

Lactobacillus equi (12,09%). Не идентифицированными до вида оказались 32,16% бактерий.

Обсуждение полученных данных и заключение

В настоящем исследовании нами впервые экспериментально был расшифрован микробиом смыва из слизистой оболочки носовой полости жеребенка с использованием NGS-секвенирования на приборе MiSeq Illumina.

В результате идентификации состава микробиома путем секвенирования переменных участков 16S rRNA гена, было установлено высокое биологическое разнообразие микробной популяции. Только на

уровне рода было определено 583 таксономических единиц бактерий.

В нашем эксперименте наиболее многочисленными типами в образце стали: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*. При этом доминирующим таксоном можно считать *Firmicutes* (73,42%), который по сообщениям других исследователей также является преобладающим в микрофлоре из различных органов здоровых лошадей.

Помимо сапрофитной микрофлоры в образце присутствовали и представители условно-патогенной микрофлоры, относящиеся к роду: *Streptococcus* (18,43%), *Moraxella* (1,1%) и другие. Третий по численности род *Gemella* (17,61%) – представляет собой род грамположительных бактерий, которые лучше всего развиваются при высоком парциальном давлении CO₂. Представители этого рода впервые были обнаружены именно на слизистых оболочках людей и животных.

Доминирующим видом в данном сообществе является *L.equi* – молочнокислая бактерия, часто встречающаяся в гастроинтестинальном тракте лошадей, которая наряду с *L.hayakitensis* и *L.equigenerosi* впервые была обнаружена в толстом кишечнике здоровых лошадей [13, 14].

Таким образом, микробиом слизистой оболочки носа жеребенка состоит из микроорганизмов, характерных для нормальной микрофлоры здоровых лошадей. Полученные данные согласуются с данными ученых, изучавших различные виды микробиома лошадей.

Между тем, считаем, что аналогичные исследования должны проводиться также и на больных животных. Изучение данных вопросов может помочь при создании лекарственных препаратов для лечения и профилактики заболеваний животных. Кроме того, освоение новых методов NGS-секвенирования позволит проводить такой же анализ вирусного и грибного состава микробиома. Поэтому исследования в данном направлении будут продолжены.

Список литературы

- 1 Lisa A. Boughner and Pallavi Singh. Microbial Ecology: Where are we now? // Postdoc J. – 2016. – V. 4 (11). – P. 3-17.
- 2 Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol Rev. -1995. – V. 59(1). – P. 143-69.
- 3 Eric J. Stewart. Growing Unculturable Bacteria // J. Bacteriol. – 2012. – V. 194. – P. 4151-4160.

4 Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1977. — Т. 74, вып. 12. — С. 5463-5467. — PMID 271968.

5 Sam Behjati and Patrick S. Tarpey. What is next generation sequencing? // Archives of Disease in Childhood. – 2013. – V. 98(6). – P. 236-238.

6 Ребриков Д.В. NGS высокопроизводительное секвенирование. – Москва: БИНОМ, 2014. – 228 с.

7 Eric Juengst and John Huss. From metagenomics to the metagenome: Conceptual change and the rhetoric of translational genomic research // Genomics, Society and Policy. – 2009. – V. 5, № 3. – P. 1-19.

8 Simon Bahrndorff, Tibebu Alemu, Temesgen Alemneh and Jeppe Lund Nielsen. The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology // International Journal of Genomics. – 2016. – Article ID 5304028, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5304028>.

9 Wenling Gao, YukiChan, MengYou, Donnabella C.Lacap-Bugler, W. KeungLeung, Rory M.Watt. In-depth snapshot of the equine subgingival microbiome // Microbial Pathogenesis. – 2016. – V. 94. – P. 76-89.

10 Perkins G.A., Bakker H.C., Burton A.J., Erb H.N., McDonough S.P., McDonough P.L., Parker J., Rosenthal R.L., Wiedmann M., Dowd S. E., and Simpson K.W. Equine Stomachs Harbor an Abundant and Diverse Mucosal Microbiota // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78(8). – P. 2522-2532.

11 Costa MC, Weese JS. The equine intestinal microbiome // Animal Health Research Reviews. – 2012. – V. 13(1). – P. 121-128.

12 Marcio C. Costa, Luis G. Arroyo, Emma Allen-Vercoe, Henry R. Stämpfli, Peter T. Kim, Amy Sturgeon, and J. Scott Weese. Comparison of the Fecal Microbiota of Healthy Horses and Horses with Colitis by High Throughput Sequencing of the V3-V5 Region of the 16S rRNA Gene // PLoS One. – 2012. – V. 7. – P. 41484.

13 Morotomi M., Yuki N, Kado Y., Kushiro A., Shimazaki T., Watanabe K., Yuyama T. *Lactobacillus equi* sp. nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from faeces of healthy horses // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – V. 52. – P. 211-214.

14 Michelle M. O' Donnell, Hugh M. B. Harris, Paul W. O'Toole, and R. Paul Ross. The Genome of the Predominant Equine *Lactobacillus* Species,

Lactobacillus equi, Is Reflective of Its Lifestyle Adaptations to an Herbivorous Host // Genome Announc. – 2014. – V. 2(1). – P. 1155-13. DOI: [10.1128/genomeA.01155-13](https://doi.org/10.1128/genomeA.01155-13).

Түйін

Мақалада сау құлынның мұрын қуысынан алынған шайындының NGS-секвенділеу нәтижесі келтірілген. Микробиом көптеген өмірлік ағза процестерді реттейді. Оның зерттеу белгілі органдардағы микроорганизмдердің өзара және жасушалармен ара қатнасу процестерді түсінуге маңызды. Дәстүрлі микробты популяциясы өсіру техникасы, физикалық-химиялық және биохимиялық тесттер арқылы зерттеледі. Осы әдістер көп уақыт алып, алдын-ала микроорганизмдерді анықтау үшін дәл емес. Жан-жақты жекелеген органдар микробиома құрамын зерттеу үшін жаңа молекулярлық-генетикалық әдістерді, атап айтқанда, NGS- келесі ұрпақ анализы (the Next Generation Sequencing) мүмкін берді.

Жаңа технологиясының көмегімен MiSeq Illumina платформасында NGS-секвендеу ДНҚ тікелей шайып алып, қоректік орталарда өсірмей жасалған. Сараптаманың ішінде барлық бактериялардың генетикалық идентификациясы өткізілді.

Генетикалық талдау көрсеткендей, құлынның мұрын қуысының микробиозы келесі түрлерден тұрады: *Firmicutes* (73,42%), *Actinobacteria* (8,36%), *Proteobacteria* (8,33%), *Cyanobacteria* (6,69%), *Bacteroidetes* (1,55%) және *Fusobacteria* (0,75%) тұрады. Қауымдастықта басымдылық түр болған *Lactobacillus equi* (12,09%). Жануарлар мүшесі мен ұлпаларындағы микробты қауымдастықты зерттеу, олардың бір-бірімен өзара және макроорганизмдермен, қалыпты және патологиялық жағдайдағы әрекеттесуі мен механизмін түсінуге көмек береді. Бұл үрдістерді білу жануарлар ауруларын емдеуге және алдын алуға арналған препараттарды құру кезінде пайдалы болады.

Summary

The article presents the results of NGS-sequencing of flushing from the nasal cavity of a healthy colt. Microbiome regulates many vital processes of the body. This study is necessary for a detailed understanding of the processes occurring between microorganisms inhabiting a particular organ and their relationship to the cells of the body. Traditionally, the microbial population is studied through cultivation techniques, physical, chemical and biochemical tests. These methods are time-consuming, take a lot of time, require prior knowledge of microorganisms of interest for their isolation from the community, and are not as accurate as

identification by genotypic methods. A comprehensive study of the microbiome composition of individual organs and tissues of organisms became possible with the advent of new molecular genetic methods, in particular NGS-sequencing of the next generation (Next Generation Sequencing).

The new technology of NGS-sequencing on the MiSeq Illumina platform, the DNA obtained directly from the flush was analyzed without the cultivation stage on nutrient media. Genetic identification of all bacteria present, including noncultivated forms, was carried out.

Genetic analysis showed that the microbiome of the foal's nose consisted of the following phylum: *Firmicutes* (73.42%), *Actinobacteria* (8.36%), *Proteobacteria* (8.33%), *Cyanobacteria* (6.69%), *Bacteroidetes* (1.55%%) and *Fusobacteria* (0.75%). The dominant species in the community was *Lactobacillus equi* (12.09%). The study of the microbial community of animal organs and tissues will help to understand the mechanism of their interaction between themselves and the macroorganism, in normal and pathology. Knowledge of these processes will be useful in the development of drugs for the treatment and prevention of animal diseases.