

Е. М. Каралова¹, Г. А. Арзуманян¹, О. С. Закарян¹, Г. Е. Восканян¹, Х. В. Саркисян², З. А. Каралян¹

Динамика изменений популяционного состава лейкоцитов периферической крови при экспериментально вызванной африканской чуме свиней

¹Институт молекулярной биологии НАН Республики Армения, Ереван;
²Научный центр животноводства и ветеринарии Республики Армения, Ереван

Сравнение популяционного состава лейкоцитов периферической крови здоровых половозрелых свиней и лейкоцитов периферической крови при экспериментально вызванной острой форме африканской чумы свиней выявило серьезные изменения в их составе как в количественном, так и в качественном аспекте с появлением новых форм клеток в периферической крови, не характерных для свиней в норме. Установлено, что при действии вируса африканской чумы свиней происходит массовая гибель клеток периферической крови, основную часть которых составляют лимфоциты и нейтрофилы, хотя гибнут все виды лейкоцитов вследствие как некроза, так и апоптоза, и их количество к концу заболевания превышает 60% популяции. Для действия вируса характерно также появление в значительном количестве атипичных лимфобластов и лимфоцитов, у большинства которых обнаружены дополнительные ядра, образование которых происходит в результате фрагментации ядер или дополнительного синтеза ДНК.

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), эритробласт, лимфобласт, атипичный лимфоцит

Dynamics of Changes in the Composition of Leukocyte Population of Peripheral Blood during the African Swine Fever

Е. М. Karalova¹, H. H. Arzumanyan¹, H. S. Zakaryan¹, H. E. Voskanyan¹, Kh. V. Sarkisyan², and Z. A. Karalyan¹

¹ Laboratory of Cell Biology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, Armenia;
² Scientific Center of Stock Breeding and Veterinary Medicine, Yerevan, Armenia

The comparison of the composition of leukocytes of peripheral blood of healthy and infected swine revealed the quantitative alterations, as well as the appearance of new cells in leukocyte population during African swine fever. It was determined that African swine fever virus induced mass-scale mortality of cells of peripheral blood, especially lymphocytes and neutrophils. The number of the dead cells reaches 60% of the initial number of all cells at the end of infection. It was also revealed that the appearance of atypical lymphocytes and lymphoblasts was observed during viral infections. Most of these cells are characterized by the presence of additional nucleus.

Key words: African swine fever virus, erythroblast, lymphoblast, atypical lymphocytes

Африканская чума свиней (АЧС), или восточно-африканская лихорадка, – высококонтагиозное заболевание, которое вызывает крупный оболочечный вирус, содержащий двуспиральную ДНК. Он является единственным представителем семейства *Asfarviridae* (Dixon et al., 2005) и обладает высокой вирулентностью.

Репродукция вируса происходит в лимфоидной и миелоидной тканях органов иммунной системы, эндотелиальных клетках кровеносных и лимфатических сосудов, но прежде всего в клетках моноцитарно-макрофагального ряда (Mebus, 1987; Gomez et al., 1999) и сопровождается цитопатическим действием на лимфоциты, макрофаги и эндотелиальные клетки. Это приводит к лейкопении и резкому ослаблению противовирусных иммунных механизмов, т. е. к иммунодефициту и смертельному исходу.

Основы биологии патологических изменений лимфоидной ткани, вызываемых АЧС, непонятны до сегодняшнего дня, однако неоспорима ключевая роль моноцитарно-макрофагальной системы и продукция ею провоспалительных цитокинов (Whittall, Parkhouse, 1997; Gomez et al., 1999).

Ранее в условиях *in vitro* в костном мозге нами было продемонстрировано возникновение атипичных

клеток под воздействием вируса АЧС (Каралова Е. М. и соавт., 2011). В связи с этим представлялось важным изучение динамики изменений в популяционном составе нейтрофилов, возможного появления их атипичных форм в периферической крови свиней при экспериментально вызванной острой форме АЧС, чему и посвящено настоящее исследование.

Материалы и методы

Работу проводили на 3 здоровых и 6 зараженных вирусом АЧС свиней с массой тела около 40 кг. Исследовали динамику изменений популяционного состава лейкоцитов периферической крови свиней при экспериментально вызванной внутримышечным введением вируса АЧС с 3-х по 7-е сутки развития болезни.

В работе использовали вирус АЧС генотипа II, поразивший Грузию, а затем и соседние страны, в том числе Армению [3, 13]. Инфекционный титр вируса АЧС определяли методом гемадсорбции [16]. Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях, составляла 10^4 гемадсорбирующих единиц (ГАЕ₅₀/мл). Периферическую кровь для приготовления мазков брали из уха здоровых и зараженных вирусом свиней. Мазки фиксировали в 96% этиловом спирте и окра-

шивали азур-эозином по Романовскому–Гимзе [12]. Подсчитывали процентное соотношение всех нейтрофилов крови, а также клеток, выявленных при патологии. Весь материал статистически обрабатывали и с помощью t-критерия оценивали значимость различий между полученными сравниваемыми значениями.

Результаты

Течение экспериментальной инфекции не отличалось от описанного в приведенных источниках. Инфекция достигала агональной стадии к концу 6-х или на 7-е сутки с момента заражения [4, 9]. В первые 2 сут после заражения симптомы практически отсутствовали, несмотря на вирусемия, наблюдаемую со 2-х суток (до 4–5 ГАЕ/мл). С 3–4-х суток наблюдали гипертермию, потерю аппетита, затем быстрое нарастание основной симптоматики, выражающееся в подъеме температуры тела до 40–42°C, снижении активности, затруднении дыхания. На 5–6-е сутки у некоторых животных обнаруживали кровь в фекалиях. Симптоматика нарастала, и на терминальной стадии (начало 7-х суток) животных умерщвляли согласно протоколу.

Изучали 12 видов клеток, из которых у здоровых свиней встречается 8 видов лейкоцитов. Из них более 60% составляют лимфоциты. Лимфобласты, эритробласты, атипичные и разрушенные клетки полностью отсутствовали. Начиная с 3-х суток от начала опыта, в крови появляются лимфобласты, количество которых составляет около 3% клеток крови. По мере удлинения сроков заболевания их количество увеличивалось более чем в 3 раза, достигая к моменту гибели животных 10% популяции (рис. 1). Атипичные лимфоциты также были обнаружены на 3-и сутки заболевания и, незначительно меняясь, сохранялись на всем протяжении болезни, в среднем составляя около 5% популяции. Количество эритробластов на 3–4-е сутки составляло 6% популяции, а уже на 4-е сутки удваивалось, сохраняясь на 5-е сутки, а затем постепенно уменьшалось и к моменту гибели составляло 3% популяции, что, вероятнее всего, связано с массовой гибелью

всех клеток периферической крови, достигающей к 7-м суткам 60% популяции.

Гибель всех видов лейкоцитов начиналась с 3-х суток заболевания и, постоянно нарастая, к 7-м суткам уменьшалась более чем в 3 раза (см. таблицу). Количество моноцитов крови зараженных свиней вплоть до 6-х суток изменялось незначительно по сравнению со здоровыми свиньями, а затем достоверно снижалось. Как и в контроле, нами не были обнаружены юные нейтрофилы, а палочкоядерные и сегментоядерные формы, составляющие в контрольной группе животных 25% популяции, в течение болезни вели себя по-разному. Если количество сегментоядерных нейтрофилов на всем протяжении болезни достоверно уменьшалось и к 7-м суткам составляло всего 0,3% клеток

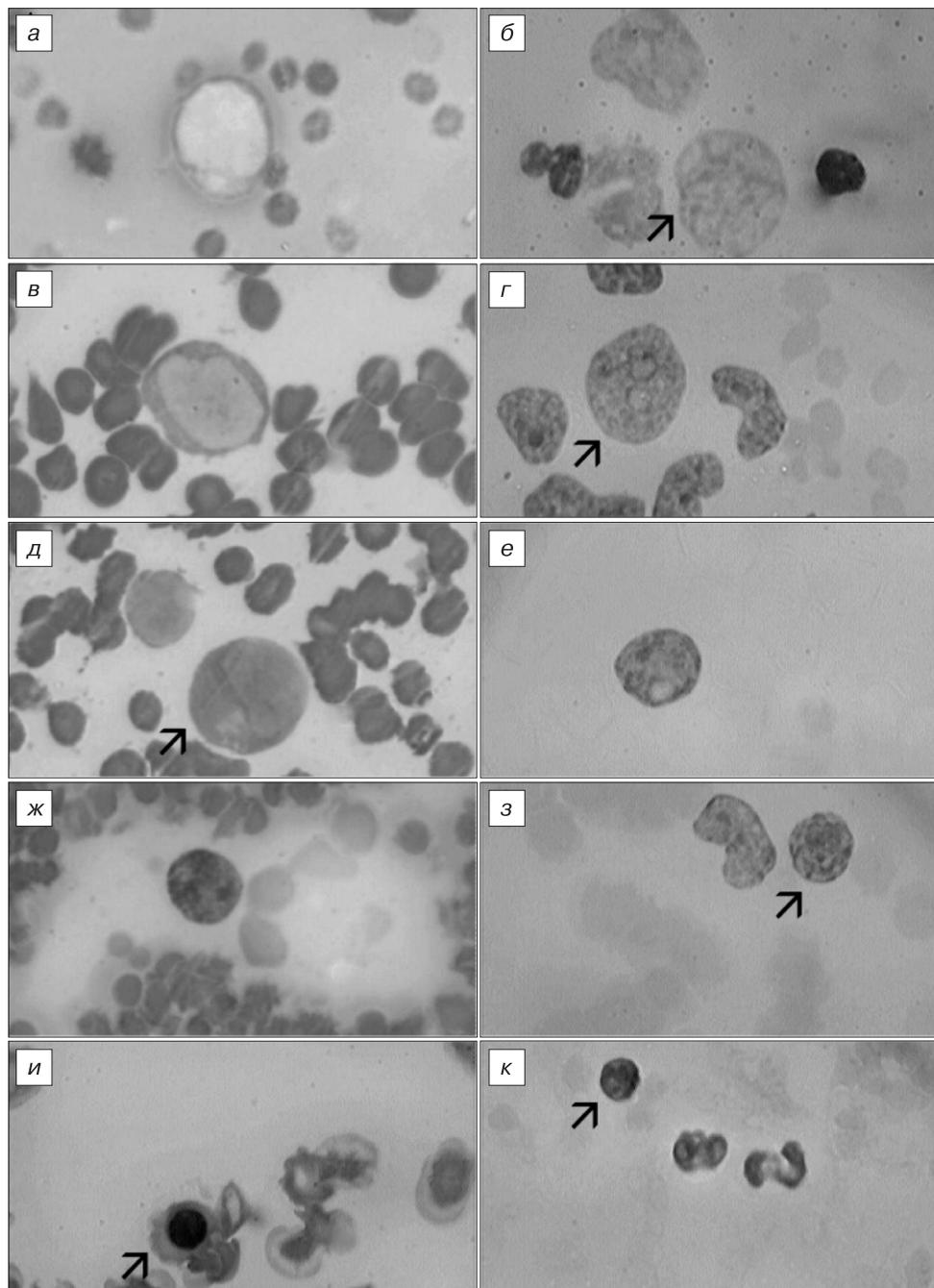


Рис. 1. Разные типы клеток периферической крови свиней при африканской чуме.

Слева – клетки, окрашенные по Гимзе (ув. 1000); справа – ядра аналогичных клеток, окрашенные реактивом Шиффа по Фельгену; А, Б, В, Г – лимфобласты, Д, Е – пролимфоциты, Ж, З – лимфоциты, И, К – оксифильные эритробласты периферической крови.

Изменение количества (в %) разных видов клеток периферической крови в норме и в различные сроки после заражения свиней вирусом АЧС

Виды клеток	Сроки после начала инфекции (периферическая кровь), сут					
	контроль	3-и	4-е	5-е	6-е	7-е
Лимфобласты	0	3,0 ± 1,1	3,5 ± 0,9	2,0 ± 0,5	9,0 ± 4,1	10,0 ± 4,0
Малые лимфоциты	45,0 ± 1,7	27,0 ± 1,8	31,0 ± 2,2	22,0 ± 1,8	19,0 ± 2,6*	11,0 ± 2,0*
Средние лимфоциты	18,0 ± 2,2	14,0 ± 1,0	15,0 ± 2,8	14,0 ± 1,9	14,0 ± 1,3	5,0 ± 1,5*
Крупные лимфоциты	4,0 ± 0,6	7,0 ± 1,4	6,0 ± 1,2	6,0 ± 1,0	7,0 ± 1,3	2,0 ± 0,7
Моноциты	6,0 ± 0,5	8,0 ± 0,7	7,0 ± 0,7	7,0 ± 0,8	7,0 ± 1,3	3,0 ± 1,2
Эозинофилы	5,0 ± 0,9	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,4	3,0 ± 0,9	0,5 ± 0,3*
Базофильные гранулоциты	2,0 ± 0,6	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,6	0,25 ± 0,3
Нейтрофилы палочкоядерные	6,0 ± 0,8	13,0 ± 1,8**	5,0 ± 0,5	8,0 ± 1,9	4,0 ± 1,5*	1,0 ± 1,0*
Нейтрофилы сегментоядерные	13,0 ± 1,6	7,0 ± 1,0*	2,0 ± 0,6*	2,0 ± 0,4*	2,0 ± 0,7*	0,25 ± 0,3*
Эритробласты	0	6,0 ± 1,1**	13,0 ± 2,2**	13,0 ± 2,0**	8,0 ± 1,2**	3,0 ± 1,0**
Атипичные лимфоциты	0	4,0 ± 1,0**	2,5 ± 0,8**	6,0 ± 1,2**	5,0 ± 1,2**	5,0 ± 1,5**
Разрушенные клетки	0	8,0 ± 2,0**	12,0 ± 3,7**	17,0 ± 3,1**	21,0 ± 4,5**	59,0 ± 5,6**
Некроз	0	5,0 ± 0,8**	5,0 ± 1,1**	8,0 ± 1,5**	10,0 ± 2,1**	37,0 ± 3,8**
Апоптоз	0	3,0 ± 0,6**	7,0 ± 1,9**	9,0 ± 1,8**	11,0 ± 2,3**	22,0 ± 2,0**

Примечание. * – достоверно ниже по сравнению с контролем ($p < 0,05$ – $p < 0,01$); ** – достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$ – $p < 0,01$).

периферической крови зараженных свиней, то количество палочкоядерных нейтрофилов на 3-и сутки болезни достоверно увеличивалось ($p < 0,001$), затем на 5-е сутки резко и достоверно уменьшалось, приближаясь к количеству палочкоядерных нейтрофилов в контроле, и держалось на этом уровне вплоть до 6-х суток, недостоверно отличаясь от количества палочкоядерных нейтрофилов в периферической крови здоровых свиней, а затем на 7-е сутки достоверно уменьшалось.

Количество эозинофильных и базофильных гранулоцитов, постоянно и неуклонно уменьшаясь, к 7-м суткам оказывалось достоверно ниже, чем в контроле. Процент моноцитов крови недостоверно снижался лишь на 7-е сутки ($p < 0,01$). Известно, что в норме в периферической крови половозрелых млекопитающих подавляющее количество клеток красной крови составляют эритроциты с небольшой долей поли- и оксифильных ретикулоцитов. При АЧС уже на 3-и сутки заболевания в периферической крови обнаруживали около 6% эритробластов, количество которых удваивалось к 4-м суткам, сохраняясь на 5-е сутки, но уже на 6-е сутки уменьшалось, а к 7-м суткам составляло 3% популяции. Важно отметить, что уже на 3-и сутки заболевания отмечена гибель всех видов исследованных клеток вследствие как некроза, так и апоптоза. При этом на протяжении всего исследования вплоть до 6-х суток включительно клетки гибли примерно одинаково обоими путями, на 7-е сутки гибель клеток вследствие некроза достоверно превосходила их гибель вследствие апоптоза. Более 20% всех клеток гибли от апоптоза.

Таким образом, можно считать, что при действии вируса чумы свиней в первую очередь поражаются лимфоциты и нейтрофилы. Для действия вируса характерно также появление в значительном количестве атипичных лимфобластов и лимфоцитов, у большинства из них обнаружены дополнительные ядра, образование которых происходит в результате фрагментации ядра или дополнительного синтеза ДНК.

Обсуждение

Полученные нами данные демонстрируют сдвиг лейкоформулы влево. Уже с 3-х суток появляются лимфобласты, а также большое количество малосегментированных палочкоядерных нейтрофилов. Для острых форм АЧС характерны лимфопения, нейтрофилия [5]. Подобные изменения начинаются примерно на 2–4-е сутки от начала заболевания [15]. Это совпадает с полученными нами данными, свидетельствующими о выраженной лейкопении уже с 3-х суток, когда среднее количество лимфоцитов уменьшалось на 30%, а к моменту гибели животных – примерно на 75%. Молекулярные механизмы столь выраженного и быстро развивающегося патогенеза не совсем ясны, однако высокий процент гибнущих клеток отмечали уже на 3-и сутки. Постоянно нарастая, этот показатель к моменту гибели животных достигал более 65% популяции. Важно отметить, что достоверное количество разрушенных лимфоцитов погибает вследствие апоптоза [9, 11].

Патогенез иммунокомпетентных клеток при АЧС в целом хорошо описан. Так, возникновение лимфопении при АЧС сравнимо с начальной стадией некоторых форм инфекционно-токсического процесса и связано с миграцией лимфоидных клеток из сосудов в ткани к очагам воспаления. Несомненно, лимфопения связана также с разрушением некоторой части лимфоидных клеток вследствие репликации вируса [9]. Нейтрофилия с выраженным сдвигом влево характерна для обширного воспаления, являющегося основной патологией при острой форме АЧС. Однако все эти проявления относятся к неспецифическим изменениям в составе крови. Более важным представляется регулярное обнаружение атипичных форм лимфоцитов и лимфобластов (рис. 2), начиная с 3-х суток заболевания, что характерно для ряда вирусных инфекций [14]. Наиболее известны атипичные формы лимфоцитов при различных герпесвирусных инфекциях, прежде всего при инфекционном моно-

нуклеозе. Необходимо отметить, что в атипичных лимфоцитах часто встречаются дополнительные ядра, образующиеся как в результате фрагментации ядер, так и, возможно, в результате синтеза ДНК и/или РНК [6, 11]. Часто именно синтез ДНК приводит к альтерациям клеточного ядра, что является одной из наиболее характерных черт атипичных лимфоцитов [14].

Другая особенность АЧС – относительно малоинформативные показатели клеточного состава периферической крови в течение первых 2 сут с момента инфицирования, когда полученные данные практически не отличались от контрольных.

Интересным представляется также обнаружение нами эритробластов в периферической крови уже на 3-и сутки заболевания. Пик их численности приходится на 4–5-е сутки. Эритробласты появляются в периферической крови млекопитающих при ряде заболеваний, в том числе при гемолитических анемиях [1, 2], что обусловлено гемолизом большого количества эритроцитов, в результате чего увеличивается скорость их образования. При АЧС гемолиз эритроцитов, вероятно, связан с ассоциацией вируса с последними и выявленный нами эритробластоз является компенсаторной реакцией на гемолиз, о чем более подробно будет сообщено в дальнейшем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аброян Л. О. Механизмы регуляции процесса восстановления эритрона при острой анемии у крыс и влияние на них Са-дс-РНГ. – Ереван, 1999.
2. Каралова Е. М., Магакян Ю. А., Аброян Л. О. Изменения в составе популяции, темпах пролиферации и специализации клеток эритроидного ряда крыс при экспериментальной анемии // Цитология. – 1993. – Т. 35, № 8. – С. 817–824.
3. Саркисян Х. В., Геворкян Г. А. Проблемы раннего выявления и отслеживания африканской чумы свиней в Армении // Ветеринарная медицина 94. – Феодосия, 2010. – С. 96–101.
4. Шуляк Б. Ф. Распространение и диагностика африканской чумы свиней // Рос. вет. журн. – 2008. – № 3. – С. 36–38.
5. DeTray D. E., Scott G. R. Blood changes in swine with African swine fever // Am. J. Vet. – 1957. – Vol. 18. – P. 484–497.

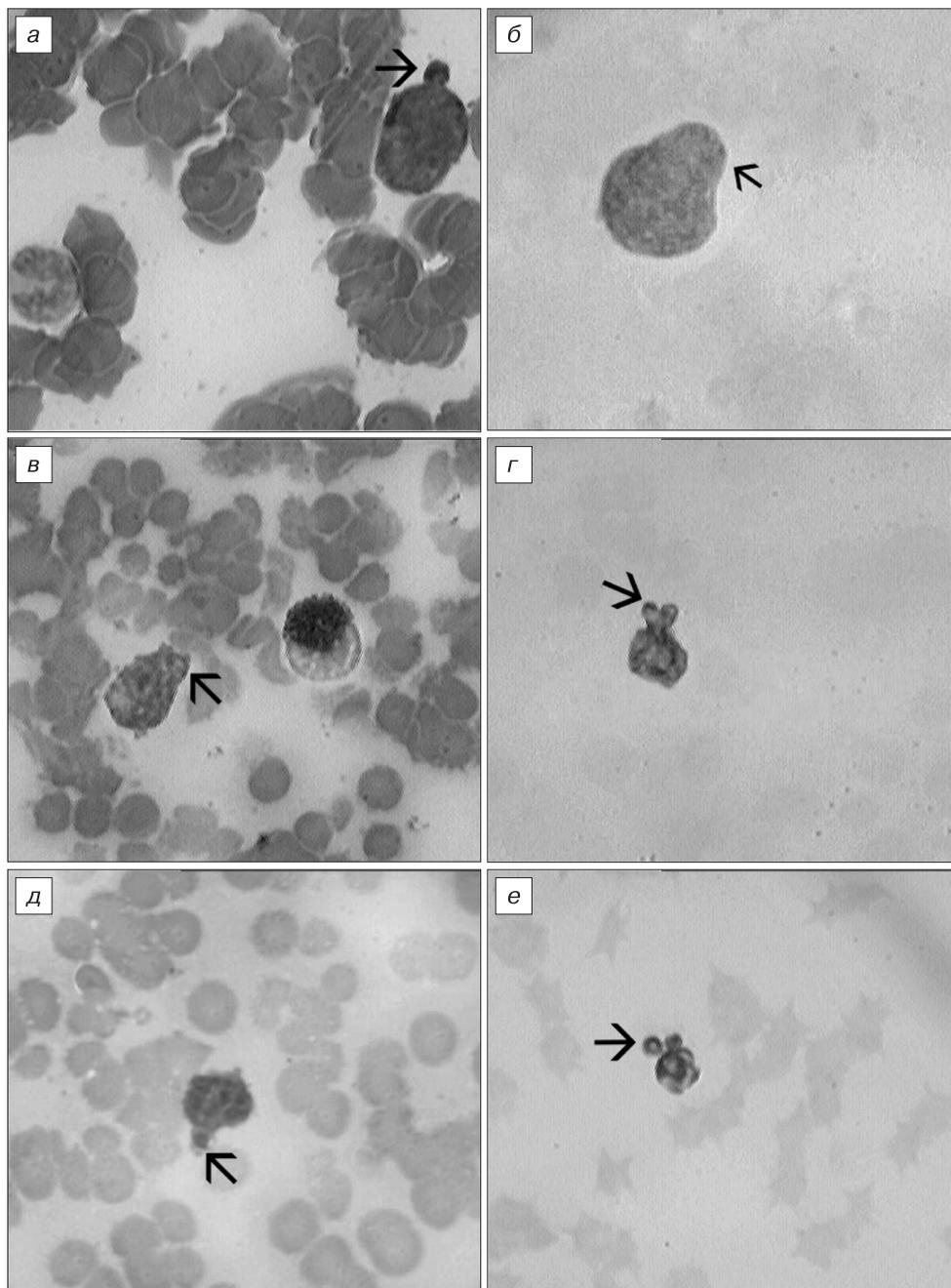


Рис. 2. Различные формы патологических лимфоидных клеток периферической крови при инфекции вирусом АЧС.

Слева – окраска клеток по Гимзе (ув. 1000); справа – окраска ядер аналогичных клеток реактивом Шиффа по Фельгену; А, Б – атипичные лимфоциты; В – эозинофил и атипичный лимфоцит (последний указан стрелкой); Г, Д, Е – атипичные лимфоциты. Дополнительные или фрагментарные ядра на всех снимках указаны стрелками.

6. Epstein L. B., Brecher G. DNA and RNA synthesis of circulating atypical lymphocytes in infectious mononucleosis // Blood. – 1965. – Vol. 25. – P. 197–2003.
7. Genovesi E. V., Knudsen R. C., Whyard T. C., Mebus C. A. Moderately virulent African swine fever virus infection: blood cell changes and infective virus distribution among blood components // Am. J. Vet. Res. – 1988. – Vol. 49, N 3. – P. 338–344.
8. Gomez-Villamandos J. C., Hervas J., Mendez A. et al. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells // J. Gen. Virol. – 1995. – Vol. 76. – P. 2399–2405.
9. Gomez-Villamandos J. C., Bautista M. J., Carrasco L. et al. African swine fever virus infection of bone marrow: Lesions and pathogenesis // Vet. Pathol. – 1997. – Vol. 34. – P. 97–107.
10. Granja A. G., Nogal M. L., Hurtado C. et al. Modulation of p53 cellular function and cell death by African swine fever virus // J. Virol. – 2004. – Vol. 78, N 13. – P. 7165–7174.
11. Horwitz D. A., Stastny P., Ziff M. Circulating deoxyribonucleic

- acid-synthesizing mononuclear leukocytes. I. Increased numbers of proliferating mononuclear leukocytes in inflammatory disease // *J. Lab. Clin. Med.* – 1970. – Vol. 76. – P. 391–402.
12. Romeis B. *Mikroskopische Technik.* – Munich, 1948.
13. Rowlands R. J., Michaud V., Heath L. et al. African swine fever virus isolate, Georgia // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 14, N 12. – P. 1870–1874.
14. Simon M. W. The atypical lymphocyte // *Int. Pediatr.* – 2003. – Vol. 18, N 1.

15. Wardley R. C., Wilkinson P. J. The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs // *Arch. Virol.* – 1977. – Vol. 55. – P. 327–334.
16. Wardley R. C., Wilkinson P. J., Hamilton F. African swine fever virus replication in porcine lymphocytes // *J. Gen. Virol.* – 1977. – Vol. 37. – P. 425–427.

Поступила 27.01.11

© Ж. С. ТЮЛЬКО, В. В. ЯКИМЕНКО, 2012
УДК 578.833.29:578.531.083.2

Ж. С. Тюлько¹, В. В. Якименко²

Корреляция изменений, возникающих в отдельных участках сегментов генома хантавирусов

¹ГОУ ВПО Омская государственная медицинская академия; ²ФГУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора

Изучали корреляции в изменениях нуклеотидной и аминокислотной последовательностей у хантавирусов генотипа Хантаан, происходящих в разных частях М- и S-сегментов. Корреляции выявляли путем сравнения замен в массивах выровненных нуклеотидных последовательностей сегментов. Были обнаружены ранее не выявленные корреляции замен нуклеотидов, локализующихся в разных (S, М) сегментах. Наличие таких корреляций может быть результатом корреляции изменений в этих сегментах, возникающей из-за особенностей третичной структуры молекул вирусной РНК.

Ключевые слова: хантавирусы, Хантаан, нуклеотидные замены, корреляции

Coordination of the Changes in Some Sites of the Hantaviral Segments

Zh. S. Tyul'ko¹ and V. V. Yakimenko²

¹ Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia; ² Omsk Scientific-Research Institute of Natural Focal Infections, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Omsk, Russia

Correlation in the changes of the nucleotide and amino acid sequences at the Hantaan virus occurring in different parts of S- and M-segments were studied. The correlation was analyzed using comparison of substitutions in aligned nucleic sequences of the segments. Correlations of the nucleotide substitutions between S- and M-segments were observed. Probably, this coordination of the changes in both segments reflects features of the tertiary structure of RNA.

Key words: hantavirus, Hantaan, nucleotides substitutions, correlation

Хантавирусы, получившие название от вируса Хантаан, выделенного в Корее [12], образуют род *Hantavirus* в составе семейства Bunyaviridae. Установлено глобальное распространение хантавирусов. Природным резервуаром и переносчиками хантавирусов являются грызуны семейств мышинных (Muridae) и хомяковых (Cricetidae). Филогения хантавирусов, как правило, соответствует филогении хозяев-грызунов [14, 16].

Известны две клинические формы хантавирусной инфекции:

– геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) в Евразии. Такое название рекомендовано ВОЗ в 1982 г. [12] для единого обозначения всех заболеваний, сходных этиологически и клинически, чтобы устранить употребление многочисленных названий – синонимов этой нозологической формы (геморрагический нефрозонефрит, эпидемическая, корейская, тульская, ярославская, уральская геморрагические лихорадки, скандинавская эпидемическая

нефропатия). Возбудителями этой формы заболевания являются хантавирусы Хантаан, Пуумала, Сеул и Добрава [14, 16].

– хантавирусный пульмонарный синдром (ХПС) в Северной и Южной Америке, вызываемый хантавирусами Нью-Йорк, Син Номбре, Блэк Крик Кэнал, Бае, Андес, Лагуна Негра и др. [9]. В отличие от ГЛПС в клинической картине ХПС основным является поражение легких (интерстициальная пневмония), сопровождающееся тяжелым течением болезни.

При развитии болезней, вызываемых этими вирусами, отмечен высокий процент летальных исходов для ГЛПС – 5–10, для ХПС – 40 [1, 9], что делает необходимым более тщательное изучение закономерностей строения и эволюции этих вирусов.

Хантавирусный геном, как и геном других буньявирусов, представлен тремя сегментами однонитевой негативной РНК: L – большой, M – средний, S – малый, которые заключены в трех вну-

Контактная информация:

Тюлько Жанна Сергеевна, канд. биол. наук, ст. преподаватель; e-mail: tjs@omsk-osma.ru