



Биол. журн. Армении, 4 (66), 2014

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

Н.Г. НЕРСИСЯН

Институт молекулярной биологии РАН,
лаборатория клеточной биологии
narek_nersisyan@yahoo.com

Исследовались мазки крови здоровых свиней. Выявлено, что эритроидная клеточная популяция состоит в основном из зрелых эритроцитов (78%), около 10% приходится на макроциты и более 8% составляют микроциты. Оказалось, что уже на ранних стадиях заболевания появляется значительное число макроцитов, количество которых, постепенно уменьшаясь, на терминальной стадии не превышает 4% популяции и микроцитов, которые на пике заболевания достигают почти трети от числа всех эритроцитов. Начиная с 4-х суток заболевания, обнаружены патологические эритроидные клетки (до 14% популяции). При нормальной насыщенности гемоглобином, соответствующей среднему содержанию последнего в контроле, и достоверно более высокому содержанию, чем в микроцитах, площадь этих эритроцитов значительно ниже, чем площадь микроцитов на соответствующей стадии АЧС. Можно предположить, что их появление связано с компенсаторными процессами, возникающими в эритропоэзе при острой АЧС.

Эритроциты – АЧС – макроциты – микроциты – гемоглобин – эритропоэз

Առողջ խոզերի արյան բուլբների հետազոտությունը ցույց տվեց, որ էրիթրոիդային բջիջների պոպուլյացիան հիմնականում կազմված է հասուն էրիթրոցիտներից (78%), մոտ 10% մակրոցիտներն են եւ ավելի քան 8% կազմում են միկրոցիտները: Պարզվեց, որ հիվանդության արդեն վաղ փուլերում մակրոցիտների մեծ քանակություն է հայտնվում: Այդ մակրոցիտների քանակը հետզհետե նվազում է և տերմինալ փուլում չի գերազանցում պոպուլյացիայի 4%-ը: Իսկ միկրոցիտների քանակը հիվանդության զագաթնակետում հասնում է էրիթրոցիտների ընդհանուր թվի մոտ մեկ երրորդին: Հիվանդության 4-րդ օրվանից սկսած հայտնաբերվում են ախտահարված էրիթրոիդային բջիջներ (պոպուլյացիայի մոտ 14%-ը): Հեմոգլոբինով նորմալ հագեցվածության պայմաններում համապատասխան վերջինիս միջին պարունակությանը ստուգիչում եւ հավաստի ավելի մեծ պարունակությանը քան միկրոցիտներում, այդ էրիթրոցիտների մակերեսը շատ ավելի փոքր է, քան իսկ-ի համապատասխան փուլում միկրոցիտների մակերեսը: Կարելի է ենթադրել, որ նրանց հայտնվելը կապված է կոմպենսատոր պրոցեսների հետ, որոնք հայտնվում են էրիթրոպոեզում սուր իսկ-ի ժամանակ:

Էրիթրոցիտ – իսկ – մակրոցիտ – միկրոցիտ – հեմոգլոբին – էրիթրոպոեզ

The study of smears of the blood of healthy pigs shows that the erytroid cell population generally consist of mature erythrocytes (78%) macrocytes (about 10%) consist and microcytes (more than 8%). Even during the early stages of the disease it appears the significant numbers of macrocytes. The number of these macrocytes during the disease is gradually decreased and in the terminal stage it is not higher than 4% of the population. The numbers of microcytes during

the peak of disease increase until one third of the total number of erythrocytes. Starting from the 4th day of disease pathological erytroid cells were detected (about 14% of the population). Within the normal saturation by hemoglobin, corresponding to the average content of hemoglobin in the control, and higher content than in the microcytes, the area of those erythrocytes is significantly lower than the area of microcytes during the appropriate stage of ASF. It can be assumed that their appearance depend from the compensatory processes which appear in the erythropoiesis during the acute ASF.

Erythrocyte – ASF – macrocyte – microcyte – hemoglobin – erythropoiesis

Африканская чума свиней (АЧС) – острая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся септициемией и 100%-ной летальностью. Возбудитель – ДНК-содержащий вирус из семейства Iridoviridae, обладающий высокой вирулентностью. Репродукция вируса происходит в лимфоидной и в миелоидной тканях органов иммунной системы, макрофагах системы мононуклеарных фагоцитов и сопровождается цитопатическим действием на лимфоциты, моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки [2, 9]. Вследствие поражения макрофагов и некроза эндотелия кровеносных сосудов, резко повышается проницаемость стенок сосудов, появляются гиперемии, тромбозы и массовые кровоизлияния в коже и во всех внутренних органах, в результате чего происходит гибель огромного числа эритроцитов [5, 6]. Подобные явления могут привести к патологии эритропоэза, в связи с чем целью настоящей работы явилось исследование особенностей нарушения эритропоэза и, в частности, развития эритроцитов при экспериментально вызванной острой форме африканской чумы свиней.

Материал и методика. В работе был использован вирус АЧС, генотип II, поразивший Грузию, а затем и соседние страны, в том числе и Армению [7]. Определение инфекционного титра вируса АЧС проводилось методом гемадсорбции [8], для чего из глазной вены здоровых и зараженных свиней брали кровь, в плазме которой определялись гемадсорбирующие титры вируса. Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях, составляла 104 гемадсорбирующих единиц - ГАЕ50/мл [1].

Эuthаназия свиней проводилась согласно протоколу Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, AVMA Guidelines on Euthanasia, and local guideline for animal care and use. Периферическая кровь для приготовления мазков бралась из глазной вены 4 здоровых и 10 зараженных вирусом свиней ежедневно. Мазки фиксировались в 96%-ном этиловом спирте и для морфологических исследований окрашивались азур-эозином по Гимзе. Определяли площадь эритроцитов и их различия по размеру. Содержание общего белка в различных по размеру эритроцитах определяли после количественной окраски нафтоловым желтым S и телевизионным методом фотометрии на сканирующем анализаторе изображений SMP 05 (OPTON) [4]. Статистическая обработка полученных данных проводилась по Стьюденту.

Результаты и обсуждение. Течение экспериментально вызванной африканской чумы свиней не отличалось от такового в цитируемых источниках и достигало агональной стадии на 7-8 сут с момента заражения [3]. Первые сутки после инфицирования протекали практически бессимптомно. Со вторых суток от начала заболевания уже обнаруживалась виремия (до 4-5 HADU50/ml), а с 3-х сут наблюдалась гипертермия, потеря аппетита, после чего следовало быстрое нарастание основной симптоматики, выражающееся в подъеме температуры тела до 40-42⁰С, снижении активности, затруднении дыхания, подкожными кровоизлияниями на ушах и конечностях. На 5-6-е сут у некоторых животных появлялась кровь в фекалиях. Симптомы заболевания манифестировались, и на 7-е сут на терминальной стадии болезни животные умерщвлялись согласно протоколу.

Гемадсорбирующие титры вируса в плазме крови инфицированных животных начали проявляться со 2-3 сут болезни и максимальных значений достигали на 4-5 сут ($4,25-5,0 \log_{10}$ HADU50/мл), оставаясь неизменными вплоть до 6-7-х сут от момента заражения животных.

Исследование мазков периферической крови здоровых свиней показало, что эритроидная клеточная популяция состоит в основном из зрелых эритроцитов (78%) Их площадь в среднем составляет $35,4 \text{ мкм}^2$, около 10% приходится на макроциты, площадь которых достигает $43,2 \text{ мкм}^2$, и более 8% составляют микроциты, площадь которых не превышает $28,0 \text{ мкм}^2$. Между средней площадью всех видов эритроцитов периферической крови свиней различия достоверны ($p < 0,001$).

Начиная с первых суток болезни и до терминальной стадии, число нормоцитов уменьшается в среднем на 33 %. Уже на первые сутки болезни количество макроцитов значительно возрастает - до 33% (на 60 % по сравнению с контролем), а затем их число, постепенно уменьшаясь, к 7-м сут достигает 4% популяции ($p < 0,001$). В то же время, если число микроцитов на вторые сутки увеличивается всего на 17%, то с развитием болезни постепенно возрастает и к терминальной стадии превышает в 2,4 раза количество микроцитов в периферической крови здоровых свиней (табл. 1).

Таблица 1. Динамика изменений соотношения различных видов эритроцитов периферической крови здоровых и больных АЧС свиней

Сутки	Соотношение различных типов эритроцитов, %			
	нормоциты	макроциты	микроциты	патологические эритроциты
Контроль	78.5	10.7	8.8	-
1	54.0	33.0	13.0	-
2	60.0	23.0	17.0	-
3	50.0	25.0	25.0	-
4	56.0	19.0	22.0	3
5	54.5	13.5	23.0	9
6	54.0	8.0	28.0	10
7	52.0	4.0	30.0	14

При этом в первые трое суток площадь нормоцитов достоверно отличается от средней площади популяции эритроцитов, площадь макроцитов достоверно выше, а микроцитов достоверно ниже, чем средняя площадь эритроцитов в контроле ($p < 0,001$). Надо отметить, что, начиная с 4-х сут болезни, в крови появляются клетки, площадь которых достоверно ниже, чем площадь микроцитов. Их число вначале не превышает 3 %, однако, постепенно увеличиваясь, к терминальной стадии достигает 14 % от числа общей популяции эритроцитов. Размеры последних достоверно ниже размеров микроцитов как контрольной, так и опытной групп (табл. 2). Однако содержание гемоглобина в этих клетках на всех сроках болезни, за исключением 6-х сут, когда сохраняется только тенденция к повышению, достоверно выше, чем в микроцитах ($p < 0,001$). При этом содержание гемоглобина в этих клетках соответствует среднему содержанию гемоглобина в популяции эритроцитов в целом.

Таким образом, нами выявлена патология эритропоэза, развивающаяся на фоне острой формы АЧС. Альтерация эритропоэза проявляется в уменьшении численности эритроцитов в периферической крови, появлении на ранних стадиях заболевания значительного числа макроцитов, количество которых, постепенно уменьшаясь,

на терминальной стадии не превышает 4% популяции, и микроцитов, которые на пике заболевания достигают почти трети от числа всех эритроцитов (табл. 3).

Таблица 2. Динамика изменений площади различных видов эритроцитов периферической крови здоровых и больных АЧС свиней

Сутки	Типы эритроцитов				Среднее по всем типам эритроцитов
	Нормо-циты	Макро-циты	Микро-циты	Патологические эритроциты	
Контроль	35,2±0,6	43,2±1,8	27,8±1,8	-	35,4±0,6
1	39,0±0,6	51,0±0,9	31,7±1,2	-	42,1±0,8
2	37,9±0,6	53,3±1,0	29,9±1,7	-	40,7±0,9
3	39,1±1,0	54,5±1,1	29,8±2,7	-	45,5±1,0
4	31,7±0,6	37,7±1,8	22,2±0,7	20,0±2,7	30,5±0,9
5	39,2±0,9	56,2±1,3	30,5±1,3	12,8±2,8	45,8±0,9
6	27,7±0,9	36,6±2,6	17,9±1,5	13,1±2,2	28,0±1,0
7	29,7±0,7	40,4±3,3	22,4±0,8	20,9±0,9	28,4±0,7

Таблица 3. Содержание гемоглобина в эритроцитах периферической крови здоровых и больных АЧС свиней

Сутки	Типы эритроцитов				Среднее по всем типам эритроцитов
	Нормо-циты	Макро-циты	Микро-циты	Патологические эритроциты	
Контроль	14,6 ±0,2	18,5±0,4	11,1±0,3	-	14,7±2,0
1	14,6±0,3	17,8±0,5	12,1±0,7	-	15,4±0,3
2	14,9±0,2	18,2±0,5	11,0±0,4	-	15,3±0,3
3	14,3±2,0	18,3±0,2	11,3±0,3	-	16,1±0,3
4	15,5±0,2	19,4±0,4	11,8±0,2	20,0±3,2	16,0±0,3
5	14,8±0,2	18,0±2,3	11,3±0,2	15,9±0,4	15,9±2,9
6	15,6±0,3	19,2±0,3	10,5±0,5	13,1±1,8	15,5±0,3
7	15,2±0,2	20,0±1,0	10,7±0,3	14,6±1,0	14,8±0,3

Начиная с 4-х сут заболевания, впервые обнаружены безъядерные эритроидные клетки, число которых возрастает в течение заболевания и к терминальной стадии достигает 14% популяции эритроидных клеток. При нормальной насыщенности гемоглобином, соответствующей среднему содержанию последнего в контроле и достоверно более высокому содержанию, чем в микроцитах, площадь этих эритроцитов значительно ниже, чем площадь микроцитов на соответствующей стадии АЧС. Можно предположить, что их появление связано с компенсаторной реакцией различных систем эритропоэза, направленных на возмещение убыли эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Enjuanes L, Carrascosa A.L, Moreno M.A., Viñuela E., Titration of African swine fever (ASF) virus. J. Gen. Virol., 32, 471-477, 1976.
2. Gomez M.M., Ortuno, E., Fernandez-Zapatero, P., Alonso, F., Alonso, C., Ezquerro, A., Dominguez, J., African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. J. Virol., 73, 3, 2173-2180, 1999.

3. *Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Moreno C., Carrasco L., Bautista M.J., Caballero J.M., Wilkinson P.J. and Sierra M.A.* Subcellular changes in the tonsils of pigs infected with acute African swine fever virus. *Vet. Res.* 28, 179-189, 1997.
4. *Магакян Ю.А., Каралова Е.М.* Цитофотометрия ДНК. Ереван, Изд-во АН Армении, 204 с., 1989.
5. *P.J. Sánchez-Cordón, J.L. Romero-Trevejo, M. Pedrera, J. Manuel Sánchez-Vizcaino, M.J. Bautista, J.C. Gómez-Villamandos,* Role of hepatic macrophages during the viral haemorrhagic fever induced by african swine fever virus, *Histology and histopathology*, V., p. 683-691, 2008.
6. *F. Rodríguez, A. Fernández, J.P. Martín De Las Mulas, M.A. Sierra, A Jover* African swine fever: morphopathology of a viral haemorrhagic disease. *Veterinary Record*, 139, p. 249-254, 1996.
7. *Rowlands, R.J., Michaud, V., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W., Dwarka, R., Onashvili, T., Albina, E., Dixon, L.K.* African swine fever virus isolate, Georgia. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 12, 1870-1874, 2008.
8. *Wardley R.C., and Wilkinson P.J.* The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs. *Arch. Virol.*, 55, 327-334, 1977.
9. *Whittall J.T.D., Parkhouse R.M.E.* Changes in swine macrophage phenotype after infection with African swine fever virus: cytokine production and responsiveness to interferon- γ and lipopolysaccharide. *Immunology*, 91, 444-449, 1997.

Поступила 04.08.2014