



Биолог. журн. Армении, 1 (67), 2015

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ (АЧС)

Д.А. САРОЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА
saroyandavid@gmail.com

Исследовалась динамика изменений популяционного состава нейтрофилов периферической крови свиней, которая с первых суток острой формы африканская чума свиней (АЧС) выявила резкое омоложение популяции нейтрофилов крови. Выявлен сдвиг лейкоформулы влево, значительное увеличение количества незрелых и наиболее молодых из распознаваемых морфологически клеток крови вплоть до миелобластов. Уже на 2-й день после инфекции (дпи) достоверно снижается общее число нейтрофилов, поэтому можно полагать, что пролиферативная фаза сменяется дегенеративной, несмотря на преобладание ранних форм миелоидных клеток. Это свидетельствует о завершении и/или эффективности компенсаторной фазы миелопоэза, а, следовательно, и углублении патологических процессов.

Африканская чума свиней – нейтрофилы – миелоциты – патогенез

Ուսումնասիրվել է խոզերի աֆրիկական ժանտախտի (ԽԱԺ) սուր ձևի ժամանակ խոզի ծայրամասային արյան նեյտրոֆիլների պոպուլյացիոն կազմի փոփոխությունների դինամիկան, որն առաջին իսկ օրերից արտահայտվել է արյան նեյտրոֆիլների կտրուկ երիտասարդացմամբ: Արտահայտվել է նաև լեյկոցիտային բանաձևի դեպի ձախ շեղում, նեյտրոֆիլների քանակի աճ՝ ընդհուպ մինչև արյան ձևաբանորեն ճանաչվող ամենաերիտասարդ բջիջները՝ միելոբլաստները: Երկրորդ օրից սկսած նեյտրոֆիլների քանակը հավաստի նվազում է, և կարելի է ենթադրել, որ չնայած արյան մեջ գերակշռել են միելոիդային բջիջները պրոլիֆերատիվ փուլը փոխարինվել է դեգեներատիվ փուլով: Սա վկայում է միելոպոեզի փոխհատուցողական փուլի ավարտի և/կամ անարդյունավետության և հետևաբար նաև՝ ախտաբանական գործընթացների խորացման մասին:

Խոզերի աֆրիկական ժանտախտ – նեյտրոֆիլներ – միելոցիտներ – պաթոգենեզ

The changes in the swine peripheral blood neutrophil population was studied, caused by acute ASF were studied. The study revealed abrupt rejuvenation from the first days of acute african swine fever (ASF). The left-shift of the differential white blood cell amount and significant increase in the number of immature cells were reported until the morphologically recognizable youngest cells – myeloblasts. The number of neutrophils was significantly reduced from 2 dpi. It is concluded that the proliferative phase is replaced by the degenerative phase, despite the prevalence of early forms of myeloid cells. This indicates the completion and/or failure of the compensatory mechanisms of myelopoiesis, and the deepening of the pathological processes.

African swine fever – neutrophils – myelocytes – pathogenesis

Африканская чума свиней – острая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся септициемией. Возбудитель – ДНК-содержащий вирус из семейства Asfarviridae, рода *Asfivirus*, обладающий высокой вирулентностью. АЧС является одним из серьезнейших трансграничных заболеваний с высокой смертностью и способна стремительно распространяться независимо от государственных границ.

Из-за отсутствия лечения и профилактики АЧС имеет тяжелые социально-экономические последствия [13]. В Армению и Нагорный Карабах АЧС была занесена в 2007 году [12]. Удержать в национальных границах высококонтагиозное заболевание не удалось, и вскоре случаи АЧС были зафиксированы в различных регионах России. Как следует из эпизоотологического анализа, скорее всего, заболевание будет иметь тенденцию к увеличению своего ареала [11].

Репродукция вируса происходит в макрофагах системы мононуклеарных фагоцитов и сопровождается цитопатическим действием на моноциты, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и эндотелиальные клетки [14, 8]. Ранее в работах лаборатории было показано, что при АЧС происходит гибель огромного числа всех видов клеток периферической крови [9].

Исследования количественного и качественного состава клеточных элементов системы кроветворения чрезвычайно важны, так как изменения, выявляемые в ее морфологической картине, являются доступными и важными индикаторами нарушений в системах кроветворения и функционирования форменных элементов крови, позволяя обнаружить их изменения при определенных патологических состояниях [15]. Хотя вирус АЧС в основном реплицируется в клетках моноцитарно-макрофагального ряда, которые являются его основной мишенью [10], он способен реплицироваться и в других клетках белой крови, наибольшее значение из которых представляют нейтрофилы [5], являющиеся самыми важными клетками неспецифической защиты организма млекопитающих. Основной функцией нейтрофилов является защита внутренней среды организма животных и человека от инфекций (бактерий и вирусов). Отсюда и цель настоящей работы в исследовании динамики изменений популяционного состава нейтрофилов периферической крови на всем протяжении острой формы АЧС.

Материал и методика. В качестве экспериментальной модели использовали 18 свиней в возрасте от 3 до 4 мес и массой 35–40 кг. С целью изучения морфологического состава лейкоцитов готовились мазки крови. Кровь бралась из глазного венозного синуса ежесуточно в одно и то же время у свиней, зараженных вирусом африканской чумы. Контролем служили те же свиньи, у которых до введения вируса брали периферическую кровь. Все мазки фиксировали в 96%-ном этиловом спирте в течение 30 мин. Морфологический анализ нейтрофилов крови проводили на мазках, окрашенных гематоксилин-эозином по РомАновскому-Гимза [3]. Определяли основной состав клеток периферической крови, их процентное соотношение, а также распределение миелоидных клеток по степени зрелости на всех сроках заболевания. На терминальной стадии (7-е сут болезни) животных умерщвляли. Эвтаназия свиней проводилась согласно протоколу Guide for the Care and Use of laboratory Animals, AVMA Guidelines (Institutional Review Board/ Independent Ethics Committee of the Institute of Molecular of NAS, IRB000o4079).

Определяли индекс сдвига ядра нейтрофилов (ис) по формуле: $ис = м + мм + п / с$, где м – миелоциты, мм – метамиелоциты, п – палочкоядерные нейтрофилы, с – сегментоядерные нейтрофилы.

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики. В каждой группе вычисляли среднее арифметическое отклонение, стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего арифметического. Достоверность различий между средними значениями определяли по статистическому критерию t Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Популяционный анализ основных клеток крови, представленный в табл. 1, показал, что большую часть лейкоцитов периферической крови здоровых свиней (около 55%) составляют лимфоциты, а на палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы в сумме приходится примерно 35% популяции лейкоцитов. Полученные данные хорошо согласуются с данными литературы [2], по которым соотношение лимфоцитов к нейтрофилам достигает 1,8, а по нашим данным в норме это соотношение достигает 1,65%. Уже с 1 дни количество нейтрофилов в периферической крови уменьшается на 22%, а, начиная с 4 дни и вплоть до терминальной стадии, оно в среднем падает на 60%. Как видно из табл. 1, в контроле мертвые клетки не были обнаружены, но, начиная с 1 дни, они появляются в периферической крови свиней и к терминальной стадии составляют чуть меньше половины популяции всех клеток крови. При этом серьезные изменения претерпевает и состав нейтрофилов периферической крови, представленный в табл. 2, в которой даются данные по распределению миелоидных клеток по степени зрелости в периферической крови свиней при острой форме африканской чумы.

Таблица 1. Популяционный анализ основных ядерных форм клеток периферической крови свиней в норме и при африканской чуме (в %)

Типы клеток	Контр	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Лимфоциты	53.5±5.1	40.8±3.1	37.2±3.1	34.3±2.5	31.1±2.1	29.7±2.6	27.4±2.4	22.7±2.2
Моноциты	10.2±1.5	13.6±1.3	16.0±1.5	17.2±1.7	18.3±2.5	17.3±1.5	16.1±1.1	10.8±0.8
Нейтрофилы	34.7±3.9	27.1±2.6	20.5±1.9	19.5±2.0	14.4±1.2	14.7±1.4	14.6±1.3	12,3±1.4
Эозин-базоф.	1.6±0.4	4.3±1.2	3.5±0.3	3.6±0.7	2.8±0.4	3.6±0.4	3.7±0.3	2.9±0.2
Эритробласты	0.0	8.0±0.9	13.0±0.7	12.5±1.3	11.9±1.6	10.9±1.4	9.5±2.0	6.1±1.0
Разрушенные	0.0	6.2±0.7	9.8±1.1	12.9±1.2	21.6±2.8	23.8±3.1	28.7±3.4	45.2±4.8

Таблица 2. Распределение миелоидных клеток по степени зрелости в периферической крови свиней при острой форме африканской чумы (%)

Типы клеток	Контр	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Нейтрофилы	34.7±3.9	27.1±2.6	20.5±1.9	19.5±2.0	14.4±1.2	14.7±1.4	14.6±1.3	12,3±1.4
Миелобласты	0.0	0.0	0.3	1.1	2.2	2.1	3.3	4.1
Промиелоциты	0.0	1.6	3.9	5.7	8.2	11.1	12.0	13.8
Метамиелоциты	1.2	8.2	14.7	15.7	21.5	23.6	27.4	34.2
Палочкоядерные	7.5	12.5	18.3	20.9	22.2	29.3	24.9	20.2
Сегментоядерные	91.3	77.7	62.8	56.6	45.9	33.9	32.4	27.7

Как видно из табл. 2, в контроле нейтрофилы представлены палочкоядерными и сегментоядерными клетками. Последние составляют не более 8% нейтрофилов периферической крови здоровых свиней, у которых в крови встречаются в незначительном количестве и юные формы (метамиелоциты составляют около 1% популяции нейтрофилов периферической крови здоровых свиней).

Уже с первых суток в крови наблюдается уменьшение числа сегментоядерных нейтрофилов на 17,0%, а число палочкоядерных нейтрофилов увеличивается на 40%, в то время как количество метамиелоцитов увеличивается более чем в 6 раз и впервые появляются промиелоциты, число которых приближается к 2,0%. На 2 дни количество сегментоядерных нейтрофилов, продолжая уменьшаться, к терминальной стадии становится более чем в 3 раза меньше, чем в контроле. При этом процент палочкоядерных нейтрофилов вплоть до 5 дни плавно повышается и на 5 дни в 4 раза

превосходит их количество по сравнению с контролем. В дальнейшем к терминальной стадии их процент несколько уменьшается, хотя продолжает превосходить их количество по сравнению с контролем в 2,5 раза. В то же время число метамиелоцитов на всем протяжении заболевания значительно возрастает и к завершающей стадии болезни составляет около трети всей миелоидной популяции в периферической крови. Наиболее ранние, морфологически распознаваемые формы миелоидных клеток, а именно промиелоциты и миелобласты, которые не встречаются в периферической крови здоровых свиней, появляются в незначительном количестве уже на 1 дни, а затем, плавно увеличиваясь, к концу болезни суммарно составляют около 20% от всей популяции миелоидных клеток крови. На рис. 1 представлены все морфологически дифференцируемые клетки миелоидного ряда, которые нами были обнаружены в периферической крови здоровых и больных африканской чумой свиней. Кроме сегментоядерных (4а) и палочкоядерных (3) нейтрофилов в периферической крови больных свиней присутствовали метамиелоциты (2b), промиелоциты (2а) и миелобласты (1). Кроме нормальных форм были выявлены и патологичные формы нейтрофилов. Это гигантские (7, 10) и гиперсегментированные (шесть и более сегментов) нейтрофилы (4b), вакуолизированные (5а) и деградирующие нейтрофилы (11, 12а).

Таким образом, с первого дня после заражения нами выявлен сдвиг миелоидной популяции влево, что проявилось как значительным увеличением числа метамиелоцитов, так и появлением промиелоцитов в периферической крови зараженных АЧС свиней. В дальнейшем выявленные нами ранее тенденции к изменению численности лейкоцитов крови сохраняются – продолжается сдвиг лейкоформулы влево, увеличивается содержание незрелых и наиболее молодых из распознаваемых морфологически клеток крови. Уже со 2 дни происходят изменения в содержании нейтрофилов – впервые их количество достоверно снижается, в результате чего можно полагать, что пролиферативная фаза начинает сменяться дегенеративной, несмотря на преобладание ранних форм – палочкоядерных нейтрофилов и более ранних форм вплоть до миелобластов. Это свидетельствует о завершении и/или несостоятельности компенсаторной фазы миелопоэза, а, следовательно, и углублении патологических процессов. Нейтрофилия, описанная рядом авторов [4], несмотря на значительное повышение содержания незрелых форм, в наших экспериментах не наблюдается ввиду снижения общего числа клеток миелоидного ряда. Изменение лейкоцитарной формулы сопутствует многим заболеваниям. Диагностическое значение этого явления велико, так как оно дает представление о тяжести состояния животных. При многих тяжелых инфекциях, в том числе и вирусных патологиях, лейкоцитарная формула меняется за счет увеличения количества палочкоядерных нейтрофилов, метамиелоцитов, и появлением в периферической крови промиелоцитов и миелобластов. Такое изменение лейкограммы с увеличением процентного содержания молодых форм миелоидных клеток называют сдвигом влево. При острой форме АЧС был выявлен их выраженный сдвиг влево, когда уже на 1 дни он был равен 0,3, затем, неуклонно нарастая, к завершающим стадиям достиг 2,6. Такое соотношение появляется при повышенной потребности организма животного в нейтрофильных лейкоцитах, превышающее возможности костного мозга. Сдвиг влево часто наблюдается при инфекционных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, интоксикациях, заболеваниях системы крови, а в нашем случае и при АЧС, что может иметь прогностическое значение [6].

Начиная с 6-го дни и на 7 дни, становятся заметными показатели, указывающие на декомпенсацию пролиферативной активности организма свиней с острой формой АЧС. Это проявляется в постепенном снижении не только нейтрофилов, но и числа лимфоцитов и моноцитов. При этом происходит достоверное увеличение содержания мертвых и разрушающихся клеток, число которых на терминальной стадии составляет около половины популяции клеток периферической крови свиней. На недостаточность пролиферационных механизмов указывает и крови свиней. На недостаточность пролиферационных механизмов указывает и снижение содержания всех клеток крови – панцитопения [1], что свидетельствует о несостоятельности компенсаторной фазы

лейкопоза, несмотря на резкое омоложение популяции нейтрофилов периферической крови уже на ранних сроках заболевания.

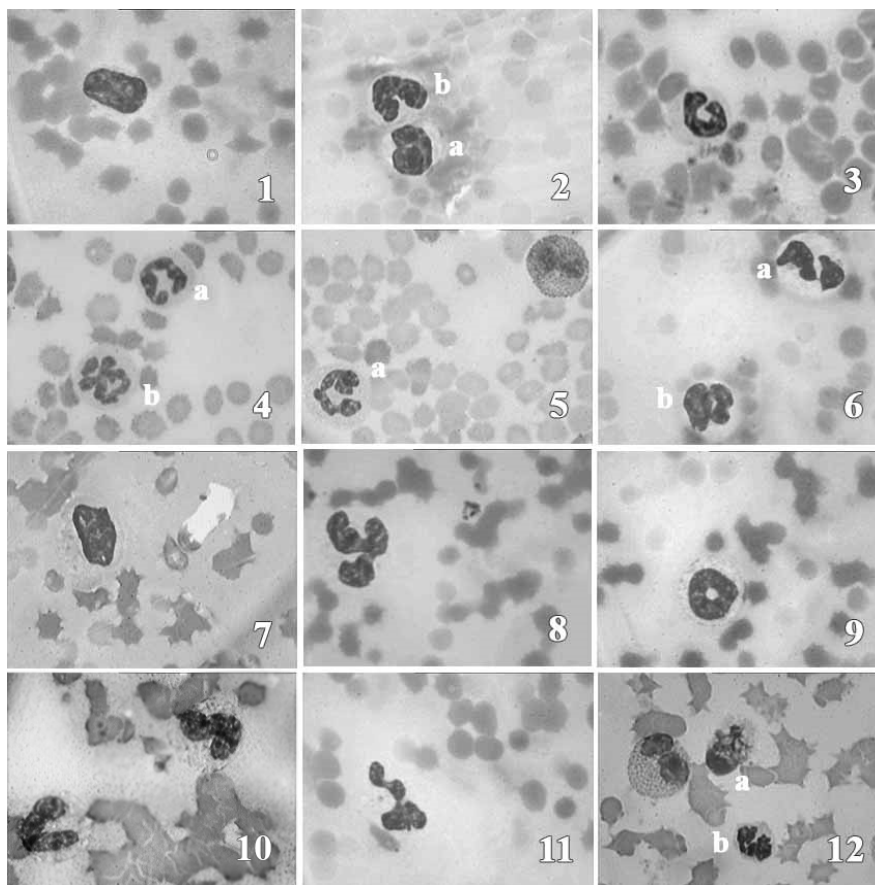


Рис.1. Клетки миелоидного ряда в норме и при АЧС.

1. Миелобласт, 2. а. промиелоцит, б. метамиелоцит, 3. палочкоядерный нейтрофил, 4. а. нормальный сегментоядерный нейтрофил, б. гиперсегментированный нейтрофил, 5. а. вакуолизированный нейтрофил, 6. а, б. бисегментные нейтрофилы, 7. и 8. гигантский промиелоцит и сегментоядерный нейтрофил, 9. патологичный палочкоядерный нейтрофил, 10. гигантские нейтрофилы, 11. кариолизис гигантского нейтрофила, 12. а. разрушающийся нейтрофил, б. патологичный сегментоядерный нейтрофил.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каралова Е.М., Арзуманян Г.А., Закарян О.С., Восканян Г.Е., Саркисян Х.В., Каралян З.А. Динамика изменений популяционного состава лейкоцитов периферической крови при экспериментально вызванной африканской чуме свиней. Вопросы вирусологии, 57, 4, с. 27-31, 2012.
2. Любин Н.А., Конова Л.Б. Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у животных, Ульяновск: ГСХА, 113 с., 2005.

3. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., Иностр. лит-ра, 648 с., 1954.
4. Темпл Х., Диам Х., Хаферлах Т. Атлас по гематологии, М: МЕД пресс-инфо, с 207, 2010.
5. Ballester M., et al. Intranuclear detection of African swine fever virus DNA in several cell types from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a new in situ hybridisation protocol. J. Virol. Methods, 168, 38-43, 2010.
6. Cavallazzi R, Bennin CL, Hirani A, Gilbert C, Marik PE. Is the band count useful in the diagnosis of infection? An accuracy study in critically ill patients. J Intensive Care Med. 25, 6, p. 353-7, 2010.
7. Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop, Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition, Wiley-Blackwell, 1232 p., 2010.
8. Gómez-Villamandos, J.C., Carrasco, L., Bautista, M.J., Sierra, M.A. Pathogenesis of African swine fever. The role of monokines. Recent Research Developments in Virology, 1, 7-17, 1999.
9. Karalyan Z., Zakaryan H., Arzumanyan H., Sargsyan K., Voskanyan H., Hakobyan L., Abroyan L., Avetisyan A., Karalova E. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. BMC Vet. Res. 8, 18. 2012.
10. Mebus C.A. Pathobiology and pathogenesis. In: African Swine Fever(Y Becker, ed), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 21-29, 1987.
11. Oura C. African swine fever virus: on the move and dangerous. Vet. Rec. Sep. 14; 173, 10, 243-5, 2013.
12. 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, 2007. Emerg Infect Dis. Dec; 14, 12, 1870-4, 2008.
13. Sanchez-Vizcaino, J.M., Martinez-Lopez, B., Martinez-Aviles, M., Martins, C., Boinas, F., Vial, L., Michaud, V., Jori, F., Etter, E., Albina, E., Roger, F. Scientific review on African swine fever, 2009.
14. Whittall, J.T.D. and Parkhouse, R.M.E. Monoclonal antibodies defining differentiation antigens of swine lymphoid and myeloid cells. Veterinary Immunology and Immunopathology, 60, 149-160, 1997.
15. Zhou Y.C., Wang Q., Fan X.Z., Xu L., Xu Z.W., Guo W.Z., Liu J., Chen L., Tang B. The changes of peripheral blood leucocytes subpopulation after challenge with CSFV virulent strain Shimen. Bing Du Xue Bao. 25, 4, 303-8, 2009.

Поступила 13.10.2014