

УДК: 619:578(075.8)

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПЛОЩАДИ И СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПРОЦЕССЕ ОСТРОЙ ФОРМЫ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Сароян Д.А., Симомян Л.Н., Акопян Л.А., Аброян Л.О., Аветисян А.С., Селмерджян З.Б.
Лаборатория клеточной биологии и вирусологии, Института молекулярной биологии НАН РА

Ключевые слова: Африканская чума свиней, вирус, нуклеиновая кислота, гемопоэтические клетки.

Африканская чума свиней (АЧС) – острое высококонтагиозное вирусное заболевание, характеризующееся септициемией и очень высокой смертностью. В Армении и Нагорном Карабахе АЧС впервые была зарегистрирована в 2007 году [10] и с тех пор имеет тенденцию к увеличению своего ареала. *In vitro* вирус размножается и обычно культивируется в моноцитах/макрофагах из различных тканевых источников и обнаруживается, главным образом, в клетках макрофагального ряда [3]. Физиология клеток системы мононуклеарных фагоцитов и их значение в иммунном ответе достаточно исследованы и описаны [1, 2]. Однако остаются малоизученными многочисленные аспекты биологии и патологии инфекционных процессов в тех случаях, когда гемопоэтические клетки являются критической мишенью или имеют преобладающее значение как при АЧС в размножении *in vivo* возбудителей различной природы, когда только гемопоэтические клетки спонтанно чувствительны к вирусу. Оказалось, что вирус АЧС способен реплицироваться и в других клетках белой крови, наибольшее значение из которых представляют нейтрофилы [11], основной функцией которых являются защита внутренней среды организма животных и человека от инфекций и которые участвуют в развитии воспалительной реакции [8]. Новые исследования выявили доказательства важной роли нейтрофилов в противовирусной защите хозяина [9]. Это терминально дифференцированные клетки, которые образуются в костном мозге, где хранятся и по мере надобности высвобождаются в кровотоки [7]. Их основной задачей является локализация и устранение вторжения микроорганизмов

и вирусов в организм, при этом используя сложные механизмы противовоспалительной и иммунной защиты [6].

Отсюда и важность исследования количественного и качественного состава клеточных элементов системы кроветворения, так как изменения, выявляемые в них, являются доступными и важными индикаторами нарушений в системе кроветворения и функционирования форменных элементов крови, и, в частности, нейтрофилов, позволяя обнаружить их изменения при определенных патологических состояниях [12, 4]. Ранее в работах лаборатории было показано, что при острой форме АЧС происходит гибель огромного числа всех видов клеток крови и появление значительного количества незрелых клеток как лимфоидного, так и миелоидного ряда [5]. Популяционный анализ нейтрофилов периферической крови показал их смещение влево не только за счет возрастания соотношения палочек/сегментов, но и появления в ней ранних форм миелоидного ряда [16].

В данной работе представлена динамика изменений размерных показателей и содержания РНК в цитоплазме, ядре и ядрышках всех морфологически распознаваемых миелоидных клеток периферической крови свиней в норме и на всем протяжении острой формы АЧС,

Материал и методы

В качестве экспериментальной модели использовали 18 свиней возрастом от 3 до 4 месяцев и весом 35-40 кг. Работу проводили на мазках клеток периферической крови, которая бралась из глазного венозного синуса [14] ежедневно в одно и то же время у



Давит Сароян

Таблица 1
Динамика изменений площади миелоидных клеток периферической крови при острой форме африканской чумы свиней (мкм²)

Площадь		Контроль	1дни	2дни	3дни	4дни	5дни	6дни	7дни
Миелобласты	Цитопл.	-	-	166.3±27.8	156±20.0	123.2±23.3	112.3±35.6	116.3±4.6	114.1±5.6
	Ядро	-	-	94.3±32.0	78.2±17.4	72.1±16.2	78.2±27.3	69.7±8.1	54.3±9.9
	Ядрышко	-	-	6.4±1.7	6.4±1.5	5.8±0.8	4.9±0.8	4.1±1.1	3.1±0.5
Промиелоциты	Цитопл.	-	58.9±9.0	78.8±9.9	120.2±12.8	125.1±11.8	122.6±10.0	129.4±12.3	121.8±21.3
	Ядро	-	39.5±6.0	45.6±2.3	65.9±13.4	66.4±9.1	73.2±3.5	77.9±6.8	74.1±9.8
	Ядрышко	-	3.0±0.5	2.6±0.2	4.0±0.2	4.3±0.6	4.6±0.5	5.5±0.7	5.6±0.8
Метамиелоциты	Цитопл.	118.6±5.2	102.2±14.3	111.3±8.0	112.5±5.7	126.4±9.5	130.1±7.2	135.2±7.3	130.8±8.2
	Ядро	72.6±8.3	53.7±6.5	50.5±8.1	42.2±3.8	45.0±3.6	68.8±3.1	67.7±3.3	61.7±2.8
	Ядрышко	7.8±3.3	3.6±0.4	3.3±0.5	2.8±0.3	2.8±0.3	3.8±0.4	4.2±1.3	3.2±0.3
Палочкоядерные Нейтрофилы	Цитопл.	104.4±11.0	94.4±7.2	107.5±7.2	114.1±5.0	111.6±5.4	112.2±5.9	112.0±0.4	134.8±5.6
	Ядро	50.4±3.9	31.7±2.5	40.9±5.6	43.6±2.4	53.5±2.8	60.5±3.5	61.2±2.9	62.4±6.7
Сегментоядерные Нейтрофилы	Цитопл.	104.3±3.8	89.8±4.0	94.8±19.9	115.6±6.6	114.2±11.3	102.9±30.0	105.2±15.8	104.6±18.1
	Ядро	55.2±2.2	30.5±1.5	39.9±6.6	42.3±3.4	52.7±1.8	52.1±11.2.0	51.8±9.7	49.2±9.2

свиней, зараженных вирусом африканской чумы. Контролем служили те же свиньи, у которых до введения вируса брали периферическую кровь. Все мазки фиксировали в 96° этиловом спирте в течение 30 мин. 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, IRB00004079).

В работе использовали вирус АЧС генотип 11, поразивший Грузию, а затем Армению [10]. Титрация и определение дозы вируса осуществлялись рутинным методом гемадсорбирующих единиц, согласно Enjuanes et al, (1977) [13]. Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях, определялась в лаборатории до начала эксперимента и составляла 10⁴ гемадсорбирующих единиц – ГАЕ_{50/мл}.

Окраска РНК галлоцианин-хромовыми квасцами

Для количественного анализа содержания РНК и размеров миелоидных клеток мазки периферической крови одновременно окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами (ГХК) в течение 48 часов в свежеприготовленном растворе на основе ГХК [15]. Для количественного анализа содержания РНК и размеров ядрышек, ядер, цитоплазмы и клетки в целом использовалась стандартная программа открытого доступа ImageJ, которая позволила определить в одной и той же клетке площадь цитоплазмы, ядра и ядрышек, а также содержание в них РНК. Все размеры клеток даны в мм², а содержание РНК в условных единицах.

Статистическая обработка

Полученные экспериментальные данные были обрабо-

таны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки «Excel» версия 13.0 с использованием раздела программы «Анализ данных», подраздела «Описательная статистика». В каждой группе для всех признаков вычисляли среднее арифметическое, стандартное отклонение и среднюю ошибку среднего арифметического. Достоверность различий между средними значениями определяли по статистическому критерию t Стюдент.

Результаты и обсуждение

Известно, что в периферической крови здоровых свиней ранние формы миелоидных клеток отсутствуют и лишь незначительный процент составляют метамиелоциты. Соотношение палочкоядерных нейтрофилов к сегментоядерным не превышает 0.3. По нашим данным подавляющее число (более 94%) составляют палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, соотношение которых друг к другу достигает 0.24. Начиная с первых суток заболевания, количество нейтрофилов в периферической крови падает, но при этом общее число популяции миелоидных клеток в крови уменьшается недостоверно. Из таблицы 1 видно, что размерные показатели как ядра, так и цитоплазмы палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в контроле почти не отличаются друг от друга. Метамиелоциты, которые составляют незначительный процент миелоидных клеток периферической крови здоровых свиней, недостоверно крупнее нейтрофилов. С первых суток размеры нейтрофилов и метамиелоцитов недостоверно уменьшаются и появляются в небольшом количестве промиелоциты, а со вторых суток обнаруживаются миелобласты - самые

Таблица 2

Динамика изменений содержания РНК в миелоидных клетках периферической крови при острой форме африканской чумы свиней (у.е.)

РНК		Контроль	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Миелобласты	Цитопл.	-	-	117.6±19.2	115.3±12.5	102.5±19.5	108.1±27.2	106.1±2.3	84.2±5.3
	Ядро	-	-	85.6±26.6	82.6±14.9	80.5±12.5	79.9±21.0	78.3±9.9	63.9±6.3
	Ядрышко	-	-	6.5±1.7	8.0±1.3	6.7±0.9	6.5±0.5	5.2±1.2	4.4±0.4
Промиелоциты	Цитопл.	-	46.1±6.9	58.0±6.8	97.2±10.9	102.8±9.1	100.1±7.2	107.6±8.3	89.0±14.8
	Ядро	-	50.6±5.9	50.4±1.5	68.2±9.9	75.8±8.9	76.2±3.0	82.6±3.8	77.6±5.8
	Ядрышко	-	4.5±0.5	4.1±0.3	5.7±0.3	6.1±0.6	6.3±0.5	6.7±0.7	6.8±0.6
Метамиелоциты	Цитопл.	85.2±3.9	77.5±10.4	80.6±5.5	82.3±4.6	93.9±7.0	89.3±5.2	91.2±4.9	95.3±5.4
	Ядро	79.6±9.0	48.7±5.8	53.7±6.3	50.7±3.3	63.1±3.7	71.8±2.4	76.4±2.7	70.8±2.0
	Ядрышко	10.0±4.2	4.2±0.4	4.2±0.4	4.4±0.3	5.5±0.6	5.7±0.4	8.5±6.2	5.7±0.3
Палочкядерные Нейтрофилы	Цитопл.	74.8±7.8	68.6±5.0	79.1±5.3	86.6±3.3	98.1±4.1	94.3±4.2	102.2±18.6	99.6±3.1
	Ядро	61.0±2.8	43.7±5.8	47.8±4.6	55.3±2.1	71.8±2.5	68.7±2.9	99.0±1.2	72.2±5.8
Сегментоядерны нейтрофилы	Цитопл.	77.2±2.8	61.8±2.9	70.1±4.5	84.6±4.9	91.8±7.6	87.7±22.8	85.2±12.8	78.9±11.6-
	Ядро	66.9±1.9	41.5±1.4	37.6±3.3	52.3±3.4	61.6±2.4	55.0±11.1	56.5±9.5	58.7±9.2

крупные клетки миелоидного ряда в периферической крови больных свиней (табл. 1).

Размеры цитоплазмы, ядра, и ядрышек последних на всем протяжении заболевания значительно, но недостоверно уменьшаются. Промиелоциты с первых суток болезни плавно, но недостоверно увеличиваются как в размерах, так и в количестве, а на метамиелоциты в терминальной стадии приходится около половины всей популяции миелоидных клеток крови и хотя размеры их ядер и цитоплазмы недостоверно увеличиваются, размеры ядрышек недостоверно уменьшаясь к завершающей стадии оказываются более чем в 2.5 раза меньше, чем в контроле. Площадь цитоплазмы и ядра палочкядерных нейтрофилов вплоть до шестых суток увеличивается незначительно и только к седьмым суткам площадь цитоплазмы примерно на 30% превышает их размеры по сравнению с контролем, хотя различия опять таки недостоверны. Возможно это связано с увеличением на последних стадиях болезни числа гигантских палочкядерных нейтрофилов, что вероятно отражается на средней площади последних. Гигантские нейтрофилы встречаются со 2дпи и вплоть до терминальной стадии болезни, но их число вначале не превышает 2% популяции нейтрофилов, а затем, плавно повышаясь, к завершающей стадии достигает 12% популяции, а число гиперсегментированных и патологичных нейтрофилов несколько выше, и к терминальной стадии достигает 15% популяции нейтрофилов.

Как видно из таблицы 2, содержание РНК в ядре и цитоплазме нейтрофилов периферической крови на всем протяжении болезни вплоть до терминальной стадии по сравнению с контролем меняется незначительно, при этом

недостоверно отличаясь друг от друга. Аналогичная картина наблюдается и с метамиелоцитами, но при этом выявляется незначительная тенденция к повышению площади цитоплазмы и уменьшению площади ядра и ядрышек. Содержание РНК в промиелоцитах, которые появляются в периферической крови в небольшом количестве на первые сутки заболевания, достоверно превышает его количество в цитоплазме, ядре и ядрышках промиелоцитов уже к третьим суткам болезни и эта тенденция сохраняется до конца заболевания.

Содержание РНК в миелобластах, которые оказались самыми ранними из обнаруженных на вторые сутки болезни миелоидных клеток, имеет тенденцию к уменьшению количества РНК во всех клеточных структурах миелобластов на протяжении заболевания.

Из всего выше сказанного можно сделать вывод, что болезнь вызывает не только резкое омоложение клеток миелоидного ряда, вплоть до появления самых молодых из распознаваемых визуально миелобластов, но и недостоверное уменьшение площади и содержания РНК в них, что возможно связано с вынужденным выбросом из костного мозга не закончивших созревание миелобластов. В то же время во всех структурах промиелоцитов размеры цитоплазмы и содержание РНК на всем протяжении заболевания вплоть до терминальной стадии значительно увеличиваются, а в метамиелоцитах и нейтрофилах сохраняется тенденция к незначительному увеличению как размеров, так и содержания РНК в их структурах. При сравнении изменений площадей исследуемых клеток и содержания в их структурах РНК оказалось, что они прямо пропорциональны.

R REFERENCES

1. Lange A, Blome S, Moennig V, Greiser-Wilke I. Pathogenesis of classical swine fever-similarities to viral haemorrhagic fevers: a review. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2011; 124(1-2):36-47.
2. Snchez-Cordgn, P. J., Nopez, A., Salguero, F. J., Pedrera, M., Fernndez de Marco, M. & Gmez-Villamandos, J. C. Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: role of macrophages and cytokines. *Vet Pathol.*, 2005, 42, 477-488.
3. Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., SaFnchez-Cordofn, P. J., Carrasco, L. and Gofmez-Villamandos, J. C. Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002 90, 11-22.
4. Sun J, Shi Z, Guo H, Tu C. Changes in the porcine peripheral blood mononuclear cell proteome induced by infection with highly virulent classical swine fever virus. *J Gen Virol.* 2010,91(Pt9): 2254-62.
5. Zaven Karalyan, Hovakim Zakaryan, Hranush Arzumanyan, Khachik Sargsyan, Henrik Voskanyan, Lina Hakobyan, Liana Abroyan, Aida Avetisyan, Elena Karalova Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. *BMC Veterinary J. Researche* 2012, 8:18, p. 1746-1754.
6. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.*, 2007, 33:657-670.
7. Borregaard, N., O.E. Sørensen, and K. Theilgaard-Munch. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.*, 2010, 28:340-3.
8. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173-182. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1785>.
9. Jenne, C.N., C.H. Wong, F.J. Zemp, B. McDonald, M.M. Rahman, P.A., Forsyth, G. McFadden, and P. Kubes. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe.*, 2013 13:169-180.
10. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, Dwarka R, Onashvili T, Albina E, Dixon LK. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008 Dec;14(12):1870-4.
11. Ballester M., et al. 2010. 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
12. Zhou YC, Wang Q, Fan XZ, Xu L, Xu ZW, Guo WZ, Liu J, Chen L, Tang B. The changes of peripheral blood leucocytes subpopulation after challenge with CSFV virulent strain Shimen. *Bing Du Xue Bao.* 2009; 25(4):303-8.
13. Enjuanes L, Carrascosa AL, Moreno MA, Viqueira E: Titration of African swine fever (ASF) virus. *J. Gen Virol* 1976, 32:471-477.
14. Stier H., Leucht W. Blood sampling from the ophthalmic venous sinus in miniature swine. *Zeitschrift fur Versuchstierkunde*, 1980 Vol. 22 No. 3 pp. 161-164
15. Sandritter, W., Kiefer, G., and Rick, W. Gallocyanine chrome alum. in: G.L. Wied (Ed.) *Introduction to quantitative cytochemistry.* Academic press, New York and London, 1966.
16. Сароян Д., Популяционный анализ нейтрофилов периферической крови в динамике развития африканской чумы свиней (АЧС), Биологический журнал Армении, 2015, т. 66 (2015), 1

R ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Ծայրամասային արյան միելոցիտների չափերի և նրանցում նուկլեինաթթվի պարունակության փոփոխությունների դինամիկան խոզերի աֆրիկական սուր ժանտախտի ժամանակ

Մարյան Գ.Ա., Մխնյան Լ.Ն., Հակոբյան Լ.Ա., Աբրոյան Լ.Օ., Ավետիսյան Ա.Ս., Մանիրյան Զ.Բ.
Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ, ՀՀ ԳԱԱ

Մեր ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ խոզերի աֆրիկական ժանտախտը (ԽԱԺ) առաջացնում է միելոիդ շարքի բջիջների կտրուկ երիտասարդացում, որի պատճառով ծայրամասային արյան մեջ հայտնվում են տեսողաբար ճանաչվող ամենաերիտասարդ բջիջները՝ միելոբլաստները: ԽԱԺ-ը առաջ է բերում նաև միելոբլաստների չափերի և դրանցում ՌՆԹ-ի քանակի ոչ հավաստի նվազում, որը հավանաբար կապված է միելոպոեզում հասունացումը չավարտած բջիջների արյան մեջ ստիպողական արտանետման հետ: Միաժամանակ, հիվանդության ընթացքում պրոմիելոցիտների ցիտոպլազմայի չափերը և բոլոր կառույցներում ՌՆԹ-ի պարունակությունը որոշակիորեն մեծանում են, իսկ մետամիելոցիտների և նեյտրոֆիլների մոտ պահպանվում է ինչպես չափերի, այնպես էլ ՌՆԹ-ի քանակի չնչին մեծացման միտում, որը ենթադրաբար կապված է ծայրամասային արյան մեջ հսկա և բազմասեգմենտ նեյտրոֆիլների առկայությամբ: Հետազոտվող բջիջների մակերեսների և նրանցում ՌՆԹ-ի պարունակության համեմատությունը ցույց տվեց, որ դրանք ուղիղ համեմատական են:

R RESUME

Dynamics of changes of sizes and nucleic acid content in peripheral blood myeloid cells during acute African swine fever

Saroyan D.A., Simonyan L.N., Hakobyan L.A., Abroyan L.O., Avetisyan A.S., Semerjyan Z.B.
Institute of Molecular Biology of Armenia, NAS RA

Our research has shown acute rejuvenation of myeloid cells until the appearance of the youngest of visually recognizable myeloid cells – myeloblasts. The area and RNA content of these cells no significantly decreased, which is probably connected to the forced release of unmaturation precursors of myelopoiesis into the blood. Meanwhile, the cytoplasm size and RNA content in all promyelocyte structures significantly increased up to the terminal stage. In metamyelocytes and neutrophils the size of cytoplasm and RNA content had a tendency of increase, which may be related to the appearance of giant hypersegmented neutrophils in the peripheral blood. When comparing the changes in the area under study cells and their content of the RNA it has been found that they are directly proportional.