

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНАХ МЫШЕЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГРИППА ПТИЦ H5N1-СУБТИПА A/GOOSE/KRASNOOZERSKOYE/627/05

Оксана Валентиновна ПОТАПОВА¹, Вячеслав Алексеевич ШКУРУПЫЙ¹, Наталья Геннадьевна ЛУЗГИНА¹, Александр Михайлович ШЕСТОПАЛОВ², Игорь Геннадьевич ДРОЗДОВ², Ирина Васильевна ОДАРЧЕНКО¹, Лидия Владимировна ШЕСТОПАЛОВА³

¹ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

²ФГУН ГНЦВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово

³Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

У беспородных мышей-самцов, инфицированных интраназально изолятом вируса гриппа А субтипа H5N1 (A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05), выделенного на территории Новосибирской области, выявлен высокий процент летальности. При морфологическом исследовании образцов органов иммуногенеза (селезенки, тимуса) от данных животных обнаружены следующие морфологические изменения: истощение лимфоидной ткани, синусовую макрофагальную гиперплазию с формированием из них многоядерных клеток, связанных с цитокинотической дисрегуляцией и задержкой каспазо-зависимого апоптоза клеток макрофагального ряда.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц H5N1 (A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05), селезенка, тимус, лимфоциты, макрофаги, многоядерные клетки, иммуноморфологическое исследование.

Высокопатогенный вирус гриппа А H5N1-субтипа представляет реальную угрозу во всех странах, включая Россию [1]. Исследования циркулирующих изолятов возбудителя демонстрируют продолжающуюся эволюцию вируса за счет мутаций и генной реассортации с появлением новых штаммов, устойчивых к имеющимся на сегодняшний день противовирусным препаратам и обладающих способностью прямой передачи от птиц человеку [2,3]. Вирус гриппа А H5N1-субтипа вызывает генерализованную инфекцию в отсутствие ранее сформировавшегося специфического иммунитета в человеческой популяции [4], что позволяет рассматривать данный тип вируса в качестве вероятной причины будущих пандемий гриппа.

Высокую летальность при данной вирусной инфекции связывают не с прямым цитопатическим действием вирусов на клетки организма, а с дисрегуляцией секреции про- и противовоспалительных цитокинов клетками иммунной системы с одновременным угнетением интерфероновой реакции и задержкой каспазо-зависимого апоптоза инфицированных вирусами макрофагов [3,5].

Так как большинство исследований вирулентности и патогенеза вируса H5N1 сделаны на штаммах, выделенных в странах Юго-Восточной Азии, остаются неизученными патогенетические и клинико-морфологические аспекты субтипов вируса H5N1, выявленных в регионах России.

Исходя из вышеизложенного, была определена цель исследования: выявить степень патогенности для млекопитающих штамма птичьего гриппа H5N1-субтипа (A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05), выделенного на территории Новосибирской области, и изучить морфологические изменения в органах иммуногенеза (тимусе и селезенке) экспериментальных животных, инфицированных данным штаммом.

Методика исследования

Исследования проведены на 105 беспородных мышях-самцах шестинедельного возраста, с массой тела 20-25 г, что позволило исключить детерминацию генотипа животных на особенности иммунного ответа. В работе использовали штамм вируса гриппа А субтипа H5N1 A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05, выделенный от павшей птицы во время вспышки заболевания

Потапова О.В. — зав. лабораторией структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний, канд.м.н., e-mail: oxdmed@yandex.ru

Шкурूपый В.И. — директор НЦКЭМ, академик РАМН, д.м.н., e-mail: sck@soramn.ru

Лузгина Н.Г. — вед.н.с. лаборатории патологической физиологии, канд.м.н., e-mail: luzgina@mail.ru

Шестопалов А.М. — зав.отделом, e-mail: shestopalov2@mail.ru

Дроздов И.Г. — генеральный директор, д.м.н., e-mail: drozdov@vector.nsc.ru

Одарченко И.В. — лаборатория структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний, н.с.

Шестопалова Л.В. — кафедра физиологии, профессор, e-mail: lv@fen.nsu.ru

в июле 2005 года на территории Новосибирской области.

Животные были разделены на 2 группы: первая группа служила контролем и была представлена 30 интактными мышами, животных второй группы инфицировали штаммом вируса гриппа А субтипа H5N1 A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05. Заражение проводили интраназально дозой МЛД₅₀ (мышинная летальная доза, применение которой вызывает гибель 50% животных). Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде.

Материал для исследования получали через 1, 2, 3, 6 и 10 суток после заражения от 15 мышей на каждом сроке после выведения их из эксперимента (под эфирным наркозом путем дислокации позвонков в шейном отделе). Объектом исследования были выбраны селезенка и тимус как центральный и периферический органы иммуногенеза.

Для светооптического исследования образцы органов фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону. Для оценки состояния органов иммуногенеза определяли величины следующих морфометрических параметров: численную плотность лимфоидных фолликулов (Nai) и их диаметр (мкм), численную плотность многоядерных клеток в синусоидах селезенки (Nai), объемную плотность фиброзной ткани (Vv).

Для иммуногистохимического исследования проводили соответствующую подготовку парафиновых срезов, включающую: депарафинизацию, регидратацию, демаскировку выявляемых антигенов в микроволновой печи с мощностью 700W, блокирование эндогенной пероксидазы, инкубирование с блокирующей сывороткой, инкубирование со специфическими моноклональными антителами к кластерам CD4+, CD8+, CD68+. (Novocastra). Время инкубации составило 1 час при комнатной температуре с последующим инкубированием со стрептавидиновым пероксидазным комплексом, ДАБ-субстратом и дополнительным докрасиванием препаратов гематоксилином. Для изучения механизмов апоптоза использовали маркеры caspase-3, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Novocastra). Для исследования роли про- и противовоспалительных цитокинов — моноклональные антитела к ИЛ-2, ИЛ-6, TNF-α. (Novocastra). Для визуализации была применена система детекции NovoLink (Novocastra).

Вычисление средних величин проводили методами вариационной статистики. Вероятность достоверности различий сравниваемых средних величин оценивали по критерию Стьюдента, достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

После заражения у животных развивался острый инфекционный процесс. Средняя продолжительность жизни составила $8,19 \pm 0,18$ суток, летальность — 85%.

Уже через сутки после заражения в селезенке отмечали снижение количества лимфоцитов в герминативной зоне фолликулов и в периартериальных зонах с последующим прогрессирующим истощением лимфоидной ткани. При иммуногистохимическом исследовании было показано одновременное уменьшение CD4/CD8 лимфоцитов. Величина показателя численной плотности фолликулов с 1 суток после инфицирования к 10 суткам развития инфекционного процесса уменьшилась в 2,2 раза с одновременным уменьшением диаметров фолликулов на 45% в эти же сроки наблюдения (табл.). Герминативные центры в фолликулах практически не визуализировали. Начиная с 1 суток после заражения животных вирусом гриппа птиц в расширенных синусоидах наблюдали гемостаз, скопления нейтрофилов, гиперплазию клеток макрофагального ряда. В синусоидах наблюдали гигантские многоядерные клетки (рис.), численная плотность которых нарастала к 10 суткам. Величина данного параметра в период с 3 по 10 сутки развития болезни возросла в 2 раза. Полученные данные могут быть свидетельством развития гемофаго-

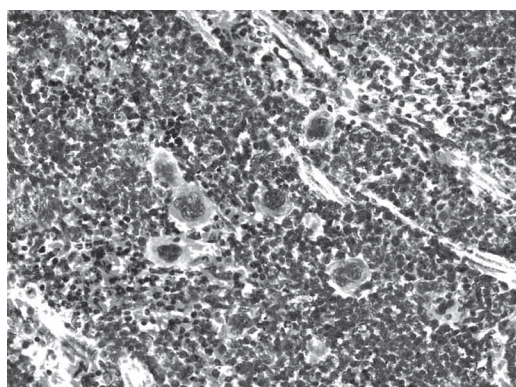


Рис. Ткань селезенки мыши на 3 сутки после инфицирования вирусом гриппа птиц H5N1 — субтипа (A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05). Истощение лимфоидной ткани с синусовой макрофагальной гиперплазией и формированием многоядерных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400.

Таблица

Морфометрические показатели структурных изменений в селезенке мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1-субтипа A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 ($M \pm m$)

Параметры	Контроль (интактные животные) n=30	Инфицированные животные				
		Срок после заражения, сутки				
		1 n=15	2 n=15	3 n=15	6 n=15	10 n=15
Численная плотность лимфидных фолликулов (Nai) в $4,2 \times 104$ мкм ²	8,42±0,51	8,2±0,41	7,65±0,26 ^a	7,02±0,31 ^a	5,62±0,51 ^{ab}	3,72±0,4 ^{ab}
Диаметр лимфоидных фолликулов, мкм	6,25±0,12	5,62±0,14	5,38±0,51	4,65±0,41	3,25±0,51	3,12±0,12
Численная плотность многоядерных клеток, (Nai) в $4,2 \times 104$ мкм ²	-----	2,78±0,18 ^a	3,15±0,16 ^{ab}	4,8±0,26	5,72±0,33	5,87±0,4 ^{ab}
Объемная плотность фиброзной ткани (Vv), %	1,25±0,11	1,83±0,16	2,56±0,22	3,02±0,12 ^a	4,16±0,85 ^{ab}	4,36±0,15 ^{ab}

Примечания: а — величины достоверно отличающихся параметров по сравнению с величинами аналогичных параметров в контрольной группе; b — величины достоверно отличающихся параметров по сравнению с величинами аналогичных параметров предыдущего срока наблюдения; n — количество животных в группах.

цитарного синдрома при вирусе гриппа птиц у млекопитающих, который может быть связан с блокадой каспазо-зависимого апоптоза макрофагов, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1[6].

Для уточнения механизма данного синдрома проводили иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами к каспазе-3 — индуктору апоптоза. Положительное окрашивание с экспрессией данного маркера в единичных макрофагах регистрировали только на 6 сутки развития инфекционного процесса, к 10 суткам количество макрофагов, экспрессирующих каспазу-3, незначительно увеличилось, однако, в гигантских клетках, которые были положительны по CD68 (маркеру макрофагов), признаков каспазо-зависимого апоптоза не наблюдали.

В динамике развития инфекционного процесса в селезенке регистрировали фибротические осложнения: разрастание фиброзной ткани наблюдали преимущественно в периваскулярных зонах. Величина показателя объемной плотности фиброзной ткани в период со 2 по 10 сутки после инфицирования вирусом гриппа птиц H5N1-субтипа увеличилась в 2,3 раза. Ранний и быстро прогрессирующий фиброз, вероятно, связан с активацией фибробластов в условиях ишемии и под влиянием провоспалительных цитокинов.

В тимусе наблюдали отек, полнокровие сосудов с тромботическими массами в просвете некоторых из них, очаги некроза с лейкоцитарной инфильтрацией. С 1 по 10 сутки развития инфекционного процесса наблюдали прогрессирующее уменьшение количества лимфоци-

тов с замещением жировой и фиброзной тканями. Наряду с данными изменениями наблюдали увеличение количества клеток макрофагального ряда с явлениями гипертрофии.

Иммуногистохимическое исследование цитокинового профиля в поврежденных тканях мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1-субтипа A/goose/Krasnoozerskoye/627/05, показало положительную экспрессию с фактором некроза опухоли-α уже на первые сутки после заражения, выраженность которой проявлялась увеличением числа положительно окрашенных клеток, в большей степени — макрофагального ряда.

В цитоплазме лимфоцитов на всех сроках наблюдения отмечали положительную реакцию с маркерами апоптоза: caspasa-3, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), что свидетельствует о развитии так называемого проапоптозного TNF-каскада. При взаимодействии этого цитокина с доменом смерти TRAIL происходит активация каспазы-8, которая индуцирует протеолиз прокаспазы-3 с образованием эффекторного энзима, расщепляющего клеточные протеины и индукцией апоптоза [7]. Это приводит к массовой гибели лимфоцитов и, как следствие, к истощению лимфоидной ткани в органах иммуногенеза с угнетением клеточного звена иммунитета. С данным феноменом, по-видимому, связана недостаточность интерфероновой ответа у экспериментальных животных, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1, которую наблюдали при исследовании цитокинового профиля в сыворотке животных [8].

Таким образом, в основе морфогенеза пато-

логических изменений в органах иммуногенеза мышей при вирусной инфекции гриппа H5N1 – субтипа (A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05) лежит, прежде всего, неполноценный противовирусный интерфероновый ответ, запускающий каскад цитокин-опосредованных реакций, приводящих к необратимым структурно-функциональным изменениям в системах органов экспериментальных животных.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Исследование и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», Госконтракт № 02.512.11.2193, и поддержана BIO INDUSTRY INITIATIVE (USA), МНТЦ (грант №3436).

Литература

1. Грипп птиц в Сибири – 2005: Лабораторные и эпидемиологические исследования, противоэпидемические и противоэпизоотические мероприятия в период эпизоотии вируса гриппа среди домашней птицы в Сибирском и Уральском федеральных округах Российской Федерации (июль – ноябрь 2005 года). Под ред. Г.Г. Онищенко. Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2006. 192.

Avian influenza in Siberia - 2005: Laboratory and epidemiologic investigation, antiepidemic and antiepzootic countermeasures in period of avian influenza epizooty among poultry in Siberian and Ural federal district of Ru-

ssian Federation (July - November 2005). Edited by G.G. Onischenko. Novosibirsk: Publishers «TsERIS», 2006. 192.

2. Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R. et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus // Lancet 1998. 351: 472–477.

3. Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarnier J, Greer PW, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals // J Virol. 2005.79:17888-800.

4. To KF, Chan PKS, Chan KF et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. J Med Virol. 2001.63:242–246.

5. Cheung CY, Poon LLM, Lu AS et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? // Lancet. 2002. 1831–1837.

6. De Jong, M. D., Simmons C. P., Thanh T. T. et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia // Nat. Med. 2006.12:1203-1207.

7. Ashkenaszi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily // Nat.Rev. Cancerl. 2002.2:420-430

8. Евсеенко В.А., Шаршов К.А., Букин Е.К. и др. Патогенез инфекционного заболевания мышей, вызванного вирусом гриппа птиц H5N1-подтипа // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. 2008. Прил.1.: 52 – 55.

Evseenko V.A., Sharshov K.A., Bukin E.K. etc. Pathogenesis of mice infectious diseases caused by avian influenza virus H5N1-subtype. Byull. eksperiment. biologii i meditsiny. 2008. Supplement.1.: 52 – 55.

STRUCTURAL CHANGES IN SPLEENES AND THIMUSE OF MICE, INFECTED AVIUM INFLUENZA SUBTYPE H5N1 VIRUS

Oksana Valentinovna POTAPOVA¹, Vjacheslav Alekseevich SHKURUPY¹, Natalia Gennadievna LUZGINA¹, Alexander Michailovich SHESTOPALOV², Igor Gennadievich DROZDOV², Irina Vasilievna ODARCHENCO¹, Lidia Vladimirovna SHESTOPALOVA³

¹State Institution Research Centre for Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences
2, Akademika Timakova str., Novosibirsk, 630117

²Ministry of public health social development of Russian Federation
«State Research Center of Virology and Biotechnology», head of department
Koltsovo, Novosibirsk region, 630559

³Novosibirsk state university, professor of department of physiology
2, Pirogova str., Novosibirsk, 630090

High mortality percent was mentioned in male mongrel mice, intranasally infected influenza subtype H5N1 (A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05) virus, which was educed in Novosibirsk region. There are some morphological changes, which were found in infected mice tissues: lymphoid tissue depletion, hyper-plasia of sinusal macrophages, forming multinucleated cells, possibly through cutokine disregulation and delay of caspase-dependent macrophage apoptosis.

Potapova O.V. – Head of the laboratory of structural bases of socially significant diseases pathogenesis

Shkurupy V.A. – director, academicion of Russian Academy of Medical Sciences

Luzgina N.G. – senior researcher of laboratory of pathologic phisiology

Shestopalov A.M. – Head of department

Drozдов I.G. – director

Odarchenco I.V. – researcher of laboratory of structural bases of socially significant diseases pathogenesis

Shestopalova L.V. – professor of department of physiology