

УДК 636.7: 591.144.4

Н.С. Алдаяров¹, А.Ш. Иргашев¹, Ж.И. Казиев²

*Кыргызский национальный аграрный университет (КНАУ) им. К.И. Скрябина¹
Казахский национальный аграрный университет²*

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ВТОРИЧНЫХ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЧУМЕ ПЛОТОЯДНЫХ

Аннотация. С помощью отдельных маркеров иммуногистохимии (CD3, CD79 α cy, MAC387, PCNA, Ki67, AK10H3) изучено морфофункциональное состояние периферических органов иммуногенеза при чуме собак. В селезенке и лимфатических узлах сильно истощены Т-, В-зоны, очаговые некротические массы обнаружены в местах локализации В-зон, что указывает на полное уничтожение иммунной системы организма собаки, что и служит доказательством иммуносупрессорной природы вируса чумы.

Ключевые слова: чума плотоядных, лимфотропизм, нейротропизм, эпителиотропизм, иммуноморфология, мультисистемность.

Введение

Одним из наиболее распространенных болезней собак вирусной этиологии является чума плотоядных. Вирус чумы плотоядных (ВЧП) - пантропный, не чувствительный к различным раздражителям вирус с одиночно-скрученной РНК-ой, относящийся к роду морбилливирусов и семейству парамиксовирусов (Pringle C.R., 1999).

ВЧП обладает уникальными свойствами как - эпителиотропность, лимфотропность, нейротропность и благодаря такой способности вирус практически заражает все органы систем, тем самым вызывая мультисистемное поражение организма собаки.

ВЧП внутри клеток выявляется в виде внутрицитоплазматических или ядерных телец включений, которые обнаруживаются в иммунокомпетентных, эпителиальных, мезенхимальных, нейроэндокринных и гематопозитических клетках (Т. Kuboetal, 2007).

Лимфотропизм и иммуносупрессорная природа ВЧП доказана результатами многих научных исследований (S. Krakowka et al, 1985; K. Hirama et al, 2003).

ВЧП не только обладает отдельными уникальными свойствами, но и отличается способностью заражать широкий круг животных дикой популяции в естественных условиях. Так, ВЧП обнаружен: у диких африканских собак, красной лисицы, каменной куницы, барсука, енотовидной собаки, хорька, койотов, волков, полярных медведей, американских диких свиней, азиатских слонов, норок, львов, леопардов, тигров, гепардов, дельфинов, тюленей и у морских свинок (M.J.Appeletal, 1994; K. Frölichetal, 2000; B.C. Damienetal, 2002; T.H. Noonetal, 2003; R.L. Zarnkeetal, 2004; J.B. Stanton etal, 2004; E.M. Geseetal, 2004; M. Tryland etal, 2005; O. Oni, etal, 2006; A.S. Hammeretal, 2007; P. Wohlsein etal, 2007). Природный резервуар вируса – это постоянная угроза эпизоотии инфекции среди дикой популяции псовых, отдельных представителей кошачьих и водных млекопитающих, а также и домашних собак.

Такая широкая распространенность ВЧП среди животных дикой фауны раскрывает ее суть и актуальность научных исследований связанных с данной проблемой, способствует разносторонним и совместным научным исследованиям биологов и ветеринаров, а также повышает значение исследований данной биомедицинской проблемы.

Материал и методы исследования

Данная работа выполнялась на кафедре ВСЭ, гистологии и патологии факультета ветмедицины и биотехнологии КНАУ им. К.И. Скрябина, в Институте ветеринарной патологии высшей ветеринарной школы города Ганновер (ФРГ, 2004), в лаборатории иммуногистохимии и гематологии Института ветеринарной патологии в городе Гиссен (ФРГ, 2005, 2006) и в Институте ветеринарной патологии Цюрихского университета (Швейцария, 2007-08).

Тканевые пробы от основных периферических органов (селезенка, поверхностные и глубокие лимфатические узлы) были получены от 6 здоровых и 58 собак больных чумой плотоядных (гистологический подтвержденный позже) в течение 2004-2007 года в Бишкеке.

Макро- и микроскопическим исследованиям подверглись все органы, в том числе и периферические органы иммуногенеза. Трупы собак вскрывали по общепринятой методике, визуально осматривали все органы. Кусочки органов фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. Обезвоживание кусочков производилось в специальной машине в вакууме и в обычных условиях нашей кафедры.

Серийные срезы готовились на санном микротоме толщиной 4-6 мкм и микротомом новой модификаций толщиной 2 мкм.

Для иммуногистохимических окрашиваний срезов восстановление антигена производили с помощью автоклава Паскаль (20 минут, +98⁰ С и 2 минут при +125⁰ С под давлением) при использовании антиген восстанавливающих буферных растворов РН 9.0 (EDTA или основной буферный раствор РН 9.0) и цитратный буфер (РН 6.0) в соответствии с инструкцией производителя. При иммуногистохимических исследованиях были использованы АВС, РАР и SABC методы для выявления Т- (CD3), В-лимфоцитов (CD79 α cy), макрофагов (MAC 387) и пролиферацию клеток (Ki-67, PCNA) и ВЧП (CDV).

Для выявления Т-лимфоцитов использовали антитело Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD 3. Code No. A. 0452; для выявления В-лимфоцитов - антитело Monoclonal Mouse Anti-Human B cell, CD 79 α cy. Clon HM 57. Code S 1699; для выявления макрофагов – антитело Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clon MAC 387. Code Nr. M0747; для выявления пролиферацию клеток - антитело Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). ClonPC10. Code-Nr. M 0879, Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67. Clone MIB-1; для выявления вируса чумы собак (ВЧС) использовали антитело - моно АК 10Н3.

Окрашивание производили вручную во влажной камере. Срезы дополнительно окрашены гематоксилином Майера, дифференцировали 1% раствором соляной кислоты (на 70⁰ном спирте), затем окрашенные гистологические срезы в предметных стеклах покрывали специальной жидкостью (глицерин - желатином) и высушивали на сушильном шкафу (55⁰ С). Предметные стекла с окрашенными срезами были покрыты прозрачной пленкой на специальной машине с помощью ксилола.

При положительной реакции клетки были окрашены в красный или коричневый цвета. Ядра клеток были окрашены дополнительно в синий цвет с помощью гематоксилина Майера.

Анализ патогистологических препаратов проводили под световым микроскопом Nikon ECLIPSE 50i при слабом и сильном увеличении. Микрофотографии были получены видеокамерой со специальным устройством Nikon прикрепленной к микроскопу Nikon ECLIPSE 50i и присоединенной к монитору компьютера марки LG, а также с помощью СКАНСКОПА (в лаборатории Института ветеринарной патологии города Цюрих), далее применяя компьютерную программу AperioImageScore получали микрофотографии желаемого увеличения (x4, x10, x20 и x40).

Протоколы вскрытия и анализ гистопрепаратов зафиксированы в специальном рабочем журнале.

Результаты исследования

Патогистологически установлено, что в пульпе селезенки четко выделяются некротизированные участки разной формы и величины (Рис. 1.А). Эти участки окружены макрофагами и отдельные макрофаги находятся среди некротизированной массы. Отмечается увеличение количества макрофагов. ВЧП позитивные клетки встречаются по всей пульпе диффузно и более компактное заселение зараженных клеток заметны В-зоне лимфоцитов (среди и вокруг некротизированной массы) (Рис. 1.В). Не наблюдаются активно функционирующие и первичные лимфоидные фолликулы. Отмечается сильное сокращение количества В-лимфоцитов и нарушение структуры лимфоидных фолликулов (Рис. 1.Д). Наряду с клетками подвергнутые некрозу отмечается высокая степень апоптозных фигур и апоптосомы (Рис. 1.Б). Т-зона клеток также подвержена сильной атрофии. Т-клетки наблюдаются по всей пульпе селезенки диффузно (Рис. 1.Г). Проллиферативная активность Т- и В-лимфоцитов низкая. Строма или скелет органа не нарушена (коллагеновые, эластические и ретикулярные волокна). Отмечается заметное увеличение нейтрофилов. Встречаются эозинофильные клетки и лаброциты.

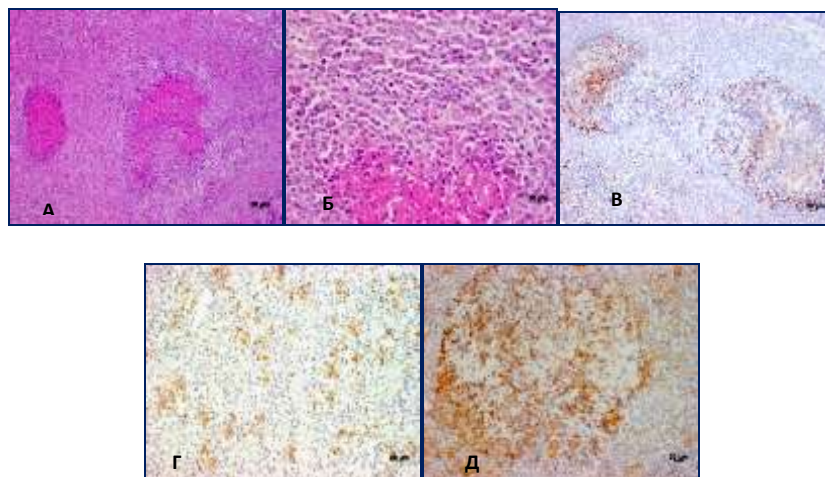


Рис. 1. Парафиновые срезы селезенки собаки. Глубокое структурное нарушение белой пульпы селезенки при заражении с ВЧП. А – некроз В-зоны и истощение Т-зоны белой пульпы. Гем. и эозин x10; Б – значительное количество фигур апоптоза и апоптосомы. Гем. и эозин x40; В – ВЧП позитивные клетки. CDVmonoAK 10N3x10; Г – диффузное заселение Т-клеток в пульпе органа x20; Д – некроз и истощение В-зоны белой пульпы, CD79 позитивные клетки. CD79асу x20.

Микроскопически как в селезенке, в лимфатических узлах отмечаются основные патологические альтерации в Т- и В-зонах лимфоидной ткани, т.е. в основном в корковом веществе органа. Коровое вещество сильно атрофировано. Картина между фолликулярной и паракортикальной зонами стерта. Обе зоны истощены и заселены диффузной лимфоидной тканью, где встречаются большое количество апоптозных фигур и апоптосомы, которые в основном хорошо просматриваются в фолликулярной зоне (Рис. 2.А). Проллиферативная активность клеток низкая (Рис. 2.В). В обеих зонах диффузно и компактно отмечаются активизированные макрофаги (Рис. 2.Е). В отдельных участках коркового вещества лимфатического узла наблюдаются некротизированные массы в местах расположений лимфоидных фолликул. На антиген ВЧП дают позитивную реакцию в массовом порядке клетки фолликулярной зоны коркового вещества (Рис. 2.Б), а в паракортикальной зоне и в мозговом веществе ВЧП позитивные клетки расположены диффузно. Т- и В-лимфоциты по всей паренхиме располагаются диффузно или группами. Из-за истощений лимфоидной ткани в паренхиме органа хорошо просматривается

эндотелиальный овал лимфатического узла. Отмечаются нейтрофилы, единичные эозинофилы и лаброциты.

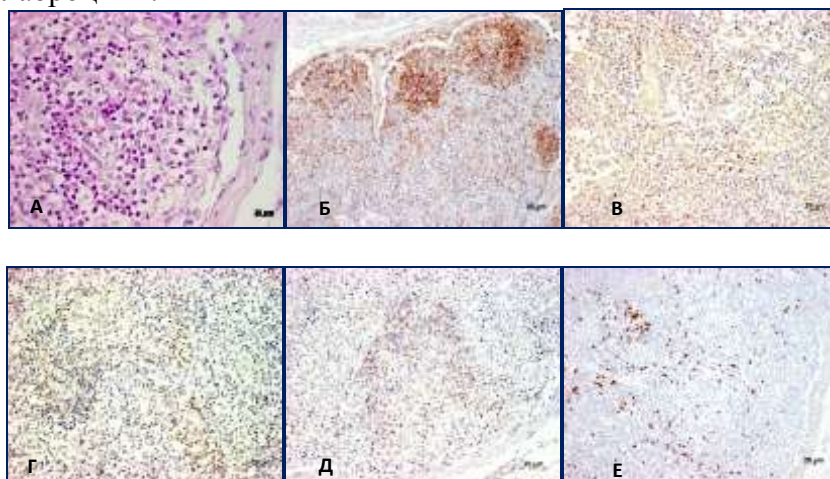


Рис. 2. Парафиновые срезы лимфатического узла собаки. Микроструктурное нарушение лимфатического узла при заражении с ВЧП. А – фолликулярная зона коркового вещества с рыхлой лимфоидной тканью (фигуры апоптоза и клетки с вирусными тельцами включениями). Гем. и эозин х40; Б – ВЧП позитивные клетки коркового вещества органа. CDVmonoAK 10H3x10; В – низкая пролиферативная активность лимфоидной ткани органа. PCNAx20; Г – истощение CD3 позитивных клеток в паракортикальной зона коркового вещества органа. CD3 x20; Д – В-клетки в фолликулярной зоне коркового вещества. CD79αсу x20; Е – диффузная инфильтрация макрофагами коркового вещества органа. MAC387 x10.

Обсуждение результатов. Как известно, организм здорового животного или человека защищается от различных антигенов с помощью отдельных физиологических механизмов (механические и химические) и факторов неспецифической и специфической защиты.

При воздействии на организм внешних и внутренних антигенов, в первую очередь реагируют регионарные центры иммунного контроля, т.е. селезенка, многочисленные лимфатические узлы, кровь и САЛТ органов различных систем организма. Такая функциональная обязанность периферических органов иммуногенеза подтверждается анатомическим расположением их в организме.

У млекопитающих основными инкапсулированными периферическими органами иммуногенеза являются селезенка и многочисленные региональные (поверхностные и глубокие) лимфатические узлы.

Селезенка, являясь полифункциональным и периферическим органом лимфоцитопоза, играет важную роль биологического фильтра, где иммунокомпетентные клетки белой пульпы обеспечивают генетический контроль протекающей крови по артериям селезенки. Также она является местом резервуара и разрушения (старые истратившие свои функциональные свойства и поврежденные) эритроцитов.

Лимфатические узлы расположены в разных участках организма на границе внутренней и внешней среды на путях возможного внедрения в организм антигенов (М.Р., Сапин 1982). Многочисленные поверхностные и глубокие лимфатические узлы, располагаясь в различных регионах (зонах) организма и каждый по отдельности снабжает определенный участок организма иммунокомпетентными клетками, с помощью которых контролируется организм от антигенного загрязнения (иммунный гомеостаз).

Периферические органы иммунной системы расположены в стратегических зонах по ходу возможного проникновения антигена.

Серьезные нарушения целостности организма отражаются в их морфофункциональной деятельности.

В норме Т-клетки постоянно находятся в активном морфофункциональном состоянии, они локализованы в основной Т зоне, в красной пульпе диффузно и они дают CD4⁺ позитивную реакцию и в В-зоне, что связано с их функцией.

Отмечаемые активные вторичные лимфоидные фолликулы (в обоих органах) в норме объясняется с тем, что гуморальный иммунитет также обезвреживает антигены эндогенного и экзогенного характера, которые встречаются в обычных условиях (против различных антигенов поступивших с пищей, с воздухом и т.д.).

В структурном и функциональном отношении Т- и В-зоны селезенки и лимфатических узлов одинаковы.

ВЧП приводит к макроскопическим и микроскопическим изменениям органов иммунной системы организма, включая атрофию тимуса, истощение Т- и В-зон с потерей вторичных лимфоидных фолликул, гиперплазию ретикулярных клеток, некроза лимфоидных фолликулов, формирование гигантских клеток с внутрицитоплазматическими и внутриядерными тельцами включениями в клетках ретикулярной и лимфоидной ткани (Appel M.J., 1994; Krakowka S. et al., 1985).

Наши исследования подтверждают исследования вышеизложенных авторов.

По результатам экспериментальных исследований при выздоровлении животного от чумы плотоядных лимфоидная ткань восстанавливается обратно (McCullough B. et al., 1974).

Анализируя данные собственных исследований и сравнивая их с литературными источниками, можно сказать, что чума плотоядных является мультисистемной болезнью, имеет очень сложный патогенез. Мы считаем, что система местного иммунитета и основные периферические лимфоидные органы не справляются с этой болезнью благодаря уникальной способности ВЧП. ВЧП обладает способностью преодолевать плазматическую мембрану и проникать в цитоплазму клеток покровного эпителия и лимфоцитов, что и подтверждаются данными отдельных исследователей. В цитоплазме вышеуказанных клеток они размножаются и развиваются. Лимфоидные клетки при встрече с вирусом заражаются им и они, генетически изменяясь, не выполняют свои непосредственные функции, циркулируя по кровеносным и лимфатическим сосудам, поражают остальные периферические органы иммуногенеза. Видимо, развивается прогрессирующий иммунодефицит организма. Тому свидетельствуют морфологические количественные и качественные изменения лимфоидной ткани основных периферических органов иммуногенеза.

Выводы

Ссылаясь на данные литературы и собственного исследования можно сделать вывод, что сильное истощение Т- и В-зоны лимфоидной ткани основных периферических органов (селезенка и лимфатические узлы) при заражении собаки ВЧП указывает на полное уничтожение защитных клеток организма и указывает на то, что ресурсы, используемые для формирования лимфоидных клеток полностью исчерпаны. Это доказывает иммуносупрессорную природу ВЧП.

Литература

1. Сапин М.Р. Лимфатический узел как орган иммунной системы // В кн.: Современный проблемы регенерации. Йошкар-Ола. 1982. С. 5-13.
2. Appel M.J.G. et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers and leopards in North America / J. Vet. Diag. Inves., 1994. 6. 277-288.
3. Damien B.C. et al. Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red fox in Luxembourg / J. of Wildlife Disease, 2002. 38 (4). 856-859.

4. Distribution of inclusion bodies in tissue from 100 dogs infected with canine distemper virus / T. Kubo, Y. Kagawa, H. Taniyama, A. Hasegawa // Vet. Med. Sc., 2007. 69(5). - P. 527-529.
5. Frölich K. Et al. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany / J. Vet. Microbiology, 2000. 74. 283-292.
6. Gese E.M. et al. Serologic survey for canine infectious diseases among sympatric swift foxes (*Vulpes velox*) and coyotes (*Canis latrans*) in Southeastern Colorado / J. of Wildlife Disease, 2004. 40(4). 741-748.
7. Hammer A.S. et al. Immunohistochemical detection of 3 viral infections in paraffin-embedded tissue from mink (*Mustela vison*): a tissue-microarray-based study / The Canadian journal of Vet. Res., 2007. 71.8-13.
8. Hirama K. et al. Cytotoxic T-lymphocyte activity specific for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs / J. Vet. Med. Sci., 2003. 65(1). 109-111.
9. Krakowka S., Axthelm M.K., Johnsen G.C. Canine distemper virus / J. Comp. Path. of Viral Diseases, 1985. 2. 1245-1254.
10. McCullough B., Krakowka S., Koestner A. Experimental canine distemper virus-induced demyelination / J. Lab. Investigation., 1974. 31. 216-222.
11. Noon T.H. et al. Serologic survey for antibodies to canine distemper virus in collared peccary (*Tayassutajacu*) population in Arizona / Journal of Wildlife disease, 2003. 39(1). 221-223.
12. Oni O. et al. Canine distemper virus antibodies in the Asian elephant (*Elaphas maximus*) / J. Vet Record, 2006. 159. 420-421.
13. Pringle C.R. Virus taxonomy / J. Arch. Virol., 1999. 142(2). 421-429.
14. Stanton J.A. et al. Retrospective differentiation of canine distemper virus and phocine distemper virus in Phocids / J. Worldwide Disease, 2004. 40(1). 53-59.
15. Tryland M. et al. Serologic survey for selected virus infections in polar bear at Svalbard / Journal of Wildlife disease, 2005. 41(2). 310-316.
16. Wohlsein P. et al. Distemper in a dolphin / J. Emer. Inf. Dis., 2007. 13(12). 1959-1961.
17. Zarnke R. L., Hoef J.M., DeLong R.A. Serologic survey for selected disease agent in wolves (*Canis lupus*) from Alaska and Yukon territory / J. Worldwide Disease, 2004. 40(4). 632-638.

Н.С. Алдаяров, А.Ш. Иргашев, Ж.И. Казиев

ИММУНДЫ ЖҮЙЕНІҢ ИНКАПСУЛЯЦИЯЛЫ ЕКІНШІЛІК АҒЗАЛАРЫНЫҢ ЕТҚОРЕКТІЛЕР ОБАСЫНДАҒЫ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬДЫ ҚАЛПЫ

Иммуногистохимияның маркерлері (CD3, CD79 α cy, MAC387, PCNA, Ki67, AK10H3) көмегімен ит обасы кезінде перифериялық ағзалары иммуногенезінің морфофункционалды қалпы зерттелген. Көк бауыр және лимфа түйіндерінде Т- және В белдеулері едәуір азғындаған. В - белдеу орныққан аймақтарда ошақты некрозды тіндер анықталған, бұл ит ағзасы иммунды жүйесінің толық жойылғандығын білдіреді, ол - оба вирусының иммуносупрессорлы табиғатынан екендігін дәлелдейді.

Кілт сөздер: ет қоректілердің обасы, лимфотропизм, нейротропизм, эпителиотропизм, иммуноморфология, мультижүйелілік.

N.S. Aldajarov, A.Sh. Irgashev, Zh.I. Kazyev

THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF ENCAPSULATE SECONDARY IMMUNE SYSTEM ORGANS IN CANINE DISTEMPER

Using some immunohistochemical markers (CD3, CD79 α cy, MAC387, PCNA, Ki67, AK10H3) were studied morphofunctional state of peripheral organs of immune system in canine distemper. T and B areas in the spleen and lymph nodes were strong cachexied, focal necrotic mass were revealed in the places where located B areas and that indicated fully destruction of immune system in dogs organism and that serve as proof of immunosuppressive nature of canine distemper virus.

Key words: plague carnivore, limfotropes, neurotop, epiteliotrop, immunomorphology, multisystem.

УДК 338.436.32

Ш.А. Альпейсов

Казахский национальный аграрный университет

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ УПРАВЛЕНИЯ КАЧЕСТВОМ И БЕЗОПАСНОСТЬЮ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ В КАЗАХСТАНЕ

Аннотация. В условиях открытого рынка, а Казахстан стал страной с открытой рыночной экономикой, первостепенное значение приобретает достижение конкурентоспособности агропромышленного комплекса и продовольственной безопасности страны. С этих позиций должны быть обоснованы направления и масштабы инновационной деятельности в аграрном секторе страны. Сложившееся положение предполагает необходимость осуществления активной инновационной деятельности в различных отраслях АПК и во всех сферах производства.

Ключевые слова: экология, инновация, сельскохозяйственное производство, пищевая безопасность, земледелие, животноводство.

Введение

По данным международных экспертов ООН к 2050 году население планеты составит 9 млрд. человек, а площади под сельхозугодия будут неуклонно сокращаться.

Чтобы обеспечить всех продовольствием, объем сельскохозяйственного производства должен увеличиться на 70%.

Казахстан занимает 9-е место по земельным площадям в мире. Сельское хозяйство является одной из ключевых отраслей нашей экономики. Поэтому от уровня развития аграрного сектора зависит благосостояние страны и качество жизни ее жителей.

Сегодня стало очевидным, что деградация почв приобрела угрожающие размеры и является одной из основных угроз глобального экологического кризиса. Из-за хищнического и безграмотного отношения к почвам идет процесс разрушения почвенного слоя, который называют «тихим кризисом планеты». А ведь 90 процентов продуктов питания человек получает именно в результате использования плодородия почв в земледелии и животноводстве.

Также остро стоит вопрос и по качеству питьевой воды. Дефицит и загрязненность воды в бассейнах рек Казахстана ухудшает качество сельскохозяйственной продукции и отрицательно влияет на состояние здоровья населения страны.

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно в мире из-за низкого качества воды умирает около 5 млн. человек. Инфекционная заболеваемость населения,