

3. Погодина, В.В. Хронический клещевой энцефалит / В.В. Погодина, М.П. Фролова, Б.А. Ерман. Новосибирск, 1986. - 232 с.
4. Окулова, Н.М. Биологические взаимосвязи в лесных экосистемах (на примере природных очагов клещевого энцефалита) / Н.М. Окулова. М., 1986. - 248 с.
5. Взаимоотношения клещей *Ixodes persulcatus* Schulze и вируса клещевого энцефалита с красной полевкой (*Clethrionomys rutilus*) в Западной Сибири / В.Н. Бахвалова, О.В. Морозова, В.А.Матвеева и др. // Паразитология. – 2003. - Т. 37. - вып.1. – С.18 – 30.
6. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the South-Eastern part of Western Siberia, Russia./ V.N. Bakhvalova, A.K. Dobrotvorsky, V.V. Panov et al. // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2006. - Vol. 6. - № 1. - P. 32 - 41.
7. Tick-borne encephalitis virus strains of Western Siberia /V.N. Bakhvalova, V.A. Rar, S.E. Tkachev et al. // *Virus Res.* – 2000. – Vol. 70. - № 1-2. – P. 1 - 12.
8. Леонова, Г.Н. Изучение вирулентности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на юге Советского Дальнего Востока / Г.Н. Леонова, С.М. Мураткина, С.П. Кругляк// Вопросы вирусол. - 1990. – Т.34. - №5. - с. 399 - 401
9. Шаманин, В.А. Применение молекулярной гибридизации с синтетическими дезоксирибонуклеотидами для дифференциации штаммов вируса клещевого энцефалита /В.А. Шаманин, А.Г. Плетнев, В.И. Злобин // Вопросы вирусол. – 1990. – Т.35. - №6. – С. 474 – 478.
10. Clarke, D.H. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses / D.H. Clarke, J. Casals // *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* - 1958. - Vol. 7. - № 5. - P. 561–573.
11. Дерябин, П.Г. Реакция нейтрализации тогавирусов на мышах и культурах клеток / П.Г. Дерябин, Г.А. Лебедева, Н.В.Логонова // Арбовирусы: методы лаб. и полев. исслед., М. 1986. - С.120 – 126.
12. Tick-borne encephalitis virus NS1 glycoprotein during acute and persistent infection of cells / J.V. Bygrysheva, V.A. Matveeva, E.Yu. Dobrikova et al. // *Virus Res.* – 2001. - Vol. 76. - P.161 – 169.
13. Лохмиллер, Р.Л. Экологические факторы и адаптивная значимость иммунитета мелких млекопитающих/ Р.Л. Лохмиллер, М.П. Мошкин // Сиб. экол. журн. - 1999. - Т. 6. - № 1. - С. 37 - 58.
14. Poidinger, P.A Persistent infection of Vero cells by the flavivirus Murray Valley encephalitis virus / P.A. Poidinger, Coelen, J.S. Mackenzie // *J. Gen. Virol.* – 1991. - Vol. 72. - P. 573 - 578.
15. Characterization of defective viral RNA produced during persistent infection of Vero cells with Murray Valley encephalitis virus / M.U Lancaster, S.I Hodgetts, J.S Mackenzie, N. Urosevic // *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72. - №3. - P. 2474 - 2482.

КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ: ПАТОМОРФОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПАТОЛОГИЯ

В.П. Конев

Омская государственная медицинская академия

Резюме

Проведен анализ распространения РНК вируса КЭ в динамике инфекции. Вирусная РНК вначале (в течение первых суток после заражения) выявлялась в лимфатических узлах. Позднее она появлялась в клетках Т-зависимых зон. В это же время вирусная РНК была выявлена в сосудистых структурах и вентрикулярной системе головного мозга. Установлена корреляция между временем репликации вирусной РНК и специфическим инициальным повреждением лимфоидной ткани и центральной нервной системы. Поднимается вопрос о роли рециркуляции лимфоцитов в распространении вируса клещевого энцефалита в организме.

Ключевые слова: РНК вируса клещевого энцефалита, патоморфология

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) остается эпидемически значимой инфекцией на территориях России и ряда стран Восточной Европы [2, 7]. В отдельных регионах (Урал, Сибирь и Дальний Восток) летальность от КЭ превышает соответствующие показатели по другим инфекциям [3].

Появление новых методов распознавания вирусов, основанных на определении последовательностей нуклеотидов в нуклеиновых кислотах [1, 6, 8, 9, 11], позволило по детекции вирусной РНК оценивать распространение вируса в организме в различные периоды инфекции и на этой основе произвести переоценку взглядов на морфогенез инфекционной болезни. Современная диагностика КЭ строится исключительно на иммунологических тестах или полимеразной цепной реакции, при этом, на основе чисто молекулярных методов диагностики, устанавливается этиология заболевания. Однако с позиций методологии общей патологии человека патоморфологические методы, требующей детального рассмотрения органопатологии, системности и клеточной патологии, представления о морфогенезе тех или иных феноменов при КЭ пережили серьезный пересмотр. В настоящее время трудно себе представить посмертную диагностику КЭ без детального осмысления с позиций пато- и морфогенеза основной непосредственной причины смерти, не ограничиваясь прижизненным вирусологическим или иммунологическим диагнозом «Клещевой энцефалит». В этом ключе и определена цель настоящего исследования, включающего экспериментальные и секционные наблюдения.

Материалы и методы

Экспериментальный КЭ моделировали на 240 беспородных белых мышах массой 9-10 г. Животных инфицировали эталонным штаммом вируса КЭ Софьин, тестированным по основным генетическим показателям. Использовали подкожный способ заражения, как наиболее полно обеспечивающий естественные условия развития инфекционного процесса. Вирус вводили в дозе 1000 LD₅₀, вызывавшей острую форму КЭ с летальным исходом на 10-12 сут после заражения. Животных опытной группы забивали через каждые сутки после заражения до наступления летального исхода.

Кроме того, исследован секционный материал от 8 больных, умерших от КЭ, вскрытие которых произведено через 1,5-2 ч от момента констатации смерти.

Проводили вирусологические и иммунологические исследования с определением титров вируса КЭ в крови и головном мозге по общепринятым методикам. По данным реакции пассивной геммагглютинации оценивали динамику гуморального иммунного ответа; клеточный иммунитет регистрировали в реакции торможения миграции лимфоцитов и спленоцитов. У забитых и павших зараженных ВКЭ животных и умерших от КЭ людей для патоморфологического исследования брали кусочки из индикаторных зон головного и спинного мозга, из лимфатических узлов, селезенки и тимуса. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, забуференном по Лилли, спирт-формалине, ацетоне, параформальдегиде. Криостатные и парафиновые срезы обрабатывали с помощью оптимально подобранных паноптических, нейрогистологических и гистохимических методик.

Для индикации вирусного антигена использовали прямой и непрямой методы иммунофлюоресценции. Оценку результатов проводили по шкале градации свечения, предложенной В. Я. Кармышевой [4]. Для индикации вирусной РНК в органах применяли метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* (МГНК *in situ*), в основе которого лежит использование меченых зондов (фрагментов ДНК-плазмиды кишечной палочки), комплементарных изучаемой РНК. С учетом высокой специфичности, метод МГНК *in situ* использовали для выявления вирусной РНК, как маркера реплицирующегося вируса [1, 5, 6, 10, 11].

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы была изучена распространенность вирусной РНК в органах иммуногенеза и в головном мозге инфицированных животных. Установлено, что уже на 2-е сут развития острого КЭ в лимфатических узлах у всех зараженных мышей определялись участки лизиса клеток на фоне расширения паракортикальной зоны за счет бласттрансформации лимфоцитов. Вирусный антиген в клетках основных структур лимфатических узлов в этот период не обнаружен. При этом вирусная РНК была зарегистрирована лишь в клетках краевого синуса, а в более поздние сроки (3-4-е сут) радиометки вирусной РНК выявлялись над цитоплазмой клеток, окружающих посткапиллярные вены в паракортикальной зоне, а также над цитоплазмой макрофагов в краевых и реже медуллярных синусах. К 5-6-м суткам после заражения животных в лимфатических узлах происходила смена реакции клеточного типа на гуморальный, что находило подтверждение в данных иммунологических исследований. К 7-8 суткам сохранялись единичные радиометки вирусной РНК над цитоплазмой макрофагов в синусах, в то время как над бластными формами клеток паракортикальных зон обнаруживались грубые радиометки. В финале инфекции клеточность паракортикальной зоны лимфатических узлов заметно уменьшалась, и одновременно происходило, как бы «обтаивание» фолликулов, что, в общем, соответствовало снижению напряженности клеточного иммунитета.

В селезенке в инкубационном периоде КЭ у зрелых мышей в короткие сроки нарастала бласттрансформация лимфоцитов периартериоллярных футляров, а с 3-х сут после заражения появлялись некротические очаги в Т-зависимых зонах. Вирусная РНК при этом обнаруживалась не только в лимфоидных образованиях, но и в макрофагах красной пульпы.

В тимусе экспериментальных животных инициальные изменения возникали через сутки после момента заражения, а вирусная РНК выявлялась на 3 сут инфекции по периферии сосудов наружного слоя коркового слоя. С момента клинической манифестации инфекционного процесса проис-

ходило значительное снижение содержания лимфоцитов в корковом слое органа. Однако, в этих участках с большим постоянством обнаруживались радиометки вирусной РНК.

Таким образом, при экспериментальном КЭ показано, что вирусный материал в лимфоидных органах накапливается уже с 1-х сут инфекции в клетках, выполняющих макрофагальную функцию, и лимфоцитах Т-зависимых зон.

В головном и спинном мозге зараженных мышей вирусная РНК наиболее рано (1-е сутки) детектировалась в сосудистых образованиях и желудочковой системе. Одновременно в этих же зонах выявлялись и участки специфического свечения вирусного антигена. На этапе клинической манифестации инфекции (5-6-е сутки) в индикаторных зонах мозга возникали васкулиты с инфильтрацией периваскулярных пространств и стенок сосудов гематогенными и нейроглиальными клетками. Поражения мозга были мозаичными, но вирусная РНК выявлялась как в сохранных, так и в поврежденных нейронах. Радиометки вирусной РНК обнаруживались и над глиальными пролифератами, а в финале инфекции лишь единичные радиометки вирусной РНК были видны в зонах деструкции нейронов.

Исследование лимфоидных органов и центральной нервной системы у умерших от КЭ людей, проводилось по общему алгоритму. Заметим, что в историях болезни всех 8 умерших имелись указания на лимфаденопатию в латентном периоде после укуса клеща. У 4 умерших спустя 2-7 сут от начала болезни в краевых синусах лимфатических узлов наблюдалось скопление лимфоцитов, свободных и фиксированных макрофагов. Однако, светлые центры фолликулов были неширокими, в паракортикальной зоне отмечалось расширение посткапиллярных венул, по периметру их накапливались лимфоидные клетки с признаками бласттрансформации, а также были видны участки оголения ретикулярной стромы. У всех умерших, во все сроки заболевания над цитоплазмой бластных клеток паракортикальной зоны локализовались радиометки вирусной РНК.

Средняя масса селезенки у всех 8 умерших пациентов составила $325,0 \pm 25,0$ г. В периартериолярных лимфоидных футлярах определялись многочисленные группы бластных клеток, встречались зоны разрежения пульпы. Лимфоидные фолликулы повсеместно выглядели округлыми, светлые центры их были расширены. Вирусная РНК, даже у умерших в первые 2 сут от начала заболевания, выявлялась в бластных клетках Т-зависимых зон, единичные радиометки регистрировались и над цитоплазмой макрофагов красной пульпы. Вирусный антиген во всех случаях определялся в зонах скопления лимфоидных клеток в красной пульпе на низком уровне. Приведенные данные позволяют утверждать, что у больных КЭ в разгаре болезни возникали изменения в лимфоидных органах, а вирусная РНК и антиген в них выявлялись в диагностически значимых количествах.

Изменения в тимусе при КЭ, прослеживались на фоне его возрастной трансформации. При этом у 4 умерших в сроки от 7 до 30 сут болезни имели место коллапс долек, инверсия слоев органа и очаговые деструктивные изменения. Вирусная РНК выявлялась, главным образом, в клетках краевой зоны коркового слоя, хотя единичные радиометки были видны и в других отделах долек. В целом же в тимусе значительных скоплений вирусной РНК и вирусного антигена обнаружить не удалось.

У всех погибших от КЭ наблюдался выраженный отек мягкой мозговой оболочки, преимущественно в базальных отделах головного мозга. В панораме поражений структур индикаторных зон мозга максимальные изменения в разные сроки течения КЭ возникали в сосудах шейного отдела спинного мозга, ствола и субэпендимарных отделов желудочковой системы. По периферии сосудов указанных отделов центральной нервной системы накапливались гематогенные и глиальные клетки с образованием пролифератов. Околососудистые инфильтраты в виде муфт встречались во всех индикаторных зонах. Вирусная РНК выявлялась над цитоплазмой клеток передних рогов спинного мозга, мозжечка, аммонова рога, реже в коре головного мозга, а вирусный антиген определялся в нейронах и сосудистых образованиях индикаторных зон на умеренном уровне.

Заключение

Прослежено распространение вирусной РНК в лимфоидной и нервной ткани в различные периоды клещевого энцефалита. В эксперименте установлено, что вирусная РНК появляется раньше всего в лимфоидной ткани и более длительно (до естественной гибели животных) присутствует в Т-зависимых зонах. Исследование секционного материала позволило установить ту же динамику расселения вируса в лимфоидных органах. При клещевом энцефалите у человека в головном и спинном мозге вирусная РНК также наблюдалась первой из составных компонентов вируса, раньше всего и с большим постоянством - в структурах капилляров, нейронах и в глиальных элементах, формирующих периваскулярные инфильтраты. Есть основание считать, что вирусная РНК является более надежным маркером вирусной репродукции (а соответственно и инфекционного процесса) в связи с тем, что она может быть обнаружена там, где существующие методы не позволяют находить ни вирусные белки, ни зрелые вирионы. Высокая специфичность биотехнологического метода гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* гарантирует диагностическую индикацию вирусной инфекции на уровне, близком к биопробе на мышцах-сосунках.

Таким образом, применение новых методических подходов к диагностике вирусных инфекций [1, 5, 6, 10] показало, что поиск в тканях вирусной РНК становится, видимо, главным в диагностическом процессе, а классическим морфологическим изменениям в органах при КЭ может быть дана

патогенетическая переоценка. В этой связи представляет интерес и трактовка роли самой вирусной РНК в повреждении клеток, капилляров и иных структур органов. По факту тропизма вирусной РНК к клеткам Т-зависимых зон лимфоидных органов можно предполагать, что одним из путей распространения вируса в организме является рециркуляция лимфоцитов.

Литература

1. Кветкова Э.А., Пиценко Н.Д., Конев В.П. и др. Гибридизация нуклеиновых кислот как метод быстрой диагностики клещевого энцефалита // Информ. метод. письмо Госкомитета по санэпиднадзору. - Омск, 1992.
2. Ерман Б.А., Конев В.П., Ройхель В.М. Вирусные инфекции центральной нервной системы (патологическая анатомия, патогенез, диагностика).- Екатеринбург, 1996. – 73 с.
3. Зиновьев А.С., Конев В.П., Кветкова Э.А. и др. Морфогенез клещевого энцефалита в свете новых данных о репликации вируса // Арх. патол. - 1996. № 2 – С. 25-28.
4. Кармышева В.Я. Применение метода флюоресцирующих антител в вирусологии: Атлас.- М.: Медицина, 1979.
5. Конев В.П. Естественный морфогенез и индуцированный патоморфоз клещевого энцефалита: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Омск, 1995.
6. Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот как метод быстрой диагностики вирусных инфекций // Вопр. вирусол. — 1985. — № 5. - С. 63-66 (редакционная статья).
7. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. - Новосибирск: Наука, 1986.
8. Шаманин В.А. Детекция штаммов вируса клещевого энцефалита методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот: Автореф. дис. ... канд.биол. наук. - Новосибирск, 1990.
9. Bruneval P., Da Silva J.-L. L'hybridisation in situ: Appli-cation a la physiologie et a la pathologie endocrinienne // Rev. fr. Lab.- 1990.- 18, N 209.- P. 73-76.
10. Capron A., Ameisen J.C. Infection et pathogenese // M/s:Med. Sci.- 1990, 6, N 6.- P. 508-509.
11. McAllister A.A., Rock D.L. Comparative Usefulness of Tissue Fixatives for in situ Virol Nucleic Acid Hybridization // J. of Histochemistry and Cytochemistry. 1985, 33, N 10.- P 1026-1032.