

УДК 619:616–006: 616–097.08

**ВЛИЯНИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА РАУШЕРА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И МОРФОЛОГИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C**<sup>1</sup>Я. Л. Русакова, младший научный сотрудник<sup>2</sup>С. Н. Магер, доктор биологических наук<sup>3</sup>В. В. Храмцов, доктор ветеринарных наук<sup>1</sup>Новосибирский НИИ патологии кровообращения  
им. акад. Е. Н. Мешалкина<sup>2</sup>Новосибирский государственный аграрный университет<sup>3</sup>Институт экспериментальной ветеринарии Сибири  
и Дальнего Востока

E-mail: Yarojana@mail.ru

*Ключевые слова:* гематологические, морфологические, иммунологические изменения, экспериментальный лейкоз Раушера, герминативные центры, паракортикальная зона лимфатических узлов

*Реферат. Показана динамика различий гематологических показателей, изменений структуры и цитоархитектоники подвздошного лимфатического узла мышей, инфицированных вирусом лейкоза Раушера. Установлено, что развитие хронического вирусиндуцированного лейкоза Раушера у экспериментальных мышей линии BALB/c характеризуется нарастающей эритропенией, лейкопенией и нормализацией количества лейкоцитов в терминальной стадии болезни. В лейкограмме зараженных мышей отмечается увеличение количества нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов; выражен дегенеративный сдвиг ядер нейтрофилов влево. Морфологические исследования позволили установить, что во время гиперпластического периода развития болезни цитоархитектоника подвздошного лимфатического узла характеризуется уменьшением транспортной функции, увеличением пролиферативной активности лимфоидных клеток под действием антигена, активацией обменных процессов в клетках В-зоны лимфатического узла, реализующего иммунный ответ. В терминальной стадии болезни морфометрия лимфатических узлов в опытной группе значительно изменяется, при этом усиливается транспортная функция подвздошного лимфатического узла и снижается его неспецифическая гуморальная иммунологическая реактивность. Клеточный состав герминативных центров меняется, при этом увеличивается количество бластных форм и митозов, что свидетельствует о процессах пролиферации, происходящих под действием антигена.*

В настоящее время в экспериментальных и клинических исследованиях уделяется большое внимание изучению морфофункционального состояния органов иммунной системы при лейкозе [1–5], в том числе при экспериментальном лейкозе животных [6–10]. Анализ структурных перестроек в центральных и периферических органах иммунной системы важен для познания процессов возникновения и развития вирусного лейкоза. Большинство результатов исследований, опубликованных в научных работах, отражают гематологические, морфологические и иммунологические показатели при вирусиндуцированном лейкозе в ранний период заболевания – от нескольких часов до 1–2,5 месяца. Нам удалось в условиях эксперимента воспроизвести хроническое развитие инфекции и изучить показатели в отдаленный период заболевания.

Цель настоящего исследования – изучить влияние вируса лейкоза Раушера на гематологические показатели и морфологию лимфоидных органов экспериментальных мышей линии BALB/c.

**ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В качестве экспериментальных животных использовали мышей линии BALB/c (Институт фармакологии, г. Томск) с исходной массой тела 18–22 г. Работа выполнялась на базе лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ ННИИПК им. акад. Е. Н. Мешалкина, лаборатории лейкозов ГНУ ИЭВСиДВ, кафедры хирургии и внутренних незаразных болезней ФГБОУ ВПО НГАУ. Все исследования проводили согласно Правилам лабораторной практики

в Российской Федерации [11] и стандартным операционным процедурам лаборатории.

Животных содержали в поликарбонатных клетках на подстилке из древесной стружки, они получали стандартный гранулированный корм (Прокорм для лабораторных животных крыс и мышей, производитель БиоПро, Россия) и профильтрованную водопроводную воду согласно стандартам, указанным в руководстве The Guide for Care and Use of Laboratory Animals [12].

Для заражения мышей опытной группы вирусом лейкоза Раушера использовали методику Института фармакологии, г. Томск. Титр вируса считали по доле селезенки зараженной мыши: селезенку массой 200 мг суспендировали с 200 мкл физиологического раствора, центрифугировали при 1000 об. 5 мин, собирали надосадок, доводили до начального объема 200 мкл, разводили в 100 мл физиологического раствора. Для заражения 1 животного брали 0,1 мл (1/1000 часть селезенки) и вводили внутрибрюшинно. Контрольной группе вводили физиологический раствор в том же количестве.

Биоматериал, полученный от животных, подвергали комплексному гематологическому и морфологическому исследованию. Контрольные исследования проводили через 2 и 11 месяцев после начала эксперимента. Забор крови проводили в утренние часы по методике, разработанной авторами A. Nemas, A. J. Smith, P. Solberg, сотрудниками Forsoksdyrveterinar-tjeneste Laboratory Animal Veterinary Services Vivarium Universitet, Bergen, в 1998 г., О.И. Степеновой в 2006 г. [13]. Количество эритроцитов, лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева, лейкоцитарную формулу определяли стандартными лабораторными методами [14]. Для гистологического исследования забирали медиальные подвздошные лимфатические узлы после естественной гибели или после декапитации животных под эфирным наркозом. Материал фиксировали 10%-м раствором формалина (формалин разводили непосредственно

перед применением физиологическим раствором натрия хлорида 0,9%-м). После стандартной гистологической проводки материал заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и азур-эозином [15, 16]. Морфометрию проводили методом точечного счёта с помощью стандартной сетки (256 точек), вмонтированной в окуляр микроскопа МБС-10. Выделение структурных компонентов и дифференцировку клеточных форм в селезенке производили с учетом «Международной гистологической номенклатуры», клетки лимфоидных органов распознавали, используя рекомендации [17–19].

Статистическую обработку полученных данных проводили методом подсчета средних арифметических (M) и стандартных ошибок (m). В таблицах информация представлена в виде  $M \pm m$ . Уровень значимости различий вариационных рядов оценивали параметрическим t-критерием Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наблюдение за мышами проводили в течение 11 месяцев. Размеры селезенки определяли пальпацией 2 раза в неделю. В опытной группе увеличение селезенки у животных произошло на 4-й неделе после заражения. Животные, зараженные вирусом, начали гибнуть с 25-го дня после заражения. К концу наблюдения летальность животных в опытной группе составила 100%.

Достоверное уменьшение количества эритроцитов в опытной группе наблюдали через 2 месяца после инфицирования – в 1,86 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Через 11 месяцев количество эритроцитов в опытной группе уменьшилось в 2,49 раза по сравнению с контролем и в 1,45 раза по сравнению с опытной группой через 2 месяца после заражения.

Таблица 1

### Гематологические показатели мышей, инфицированных вирусом лейкоза Раушера, в динамике

Количество в 1 мкл крови	Опытная группа (n = 9)		Контрольная группа (n = 9)	
	2 мес	11 мес	2 мес	11 мес
Эритроцитов	$5,39 \cdot 10^6 \pm 0,43^*$	$3,73 \cdot 10^6 \pm 0,15^{**\Delta}$	$10,03 \cdot 10^6 \pm 0,4$	$9,29 \cdot 10^6 \pm 0,35$
Лейкоцитов	$4,19 \cdot 10^3 \pm 0,68^*$	$5,12 \cdot 10^3 \pm 0,74$	$8,17 \cdot 10^3 \pm 1,2$	$7,78 \cdot 10^3 \pm 0,94$

*Примечание.* Здесь и далее: \*разница достоверна (при  $P \leq 0,05$ ) в сравнении с данными контрольной группы через 2 месяца наблюдения; \*\*разница достоверна (при  $P \leq 0,05$ ) в сравнении с данными контрольной группы через 11 месяцев наблюдения;  $\Delta$  разница достоверна (при  $P \leq 0,05$ ) в сравнении с данными опытной группы через 2 месяца наблюдения.

Таблица 2

**Динамика показателей лейкограммы крови мышей, инфицированных вирусом лейкоза Раушера**

Показатели лейкограммы	Опытная группа (n = 9)		Контрольная группа (n = 9)	
	2 мес	11 мес	2 мес	11 мес
Базофилы	0,11±0,11	0,11±0,11	-	-
Эозинофилы	0,33±0,17	15,0±0,5 <sup>Δ</sup>	0,44±0,24	0,44±0,29
Нейтрофилы юные	1,22±0,23 <sup>*</sup>	0,78±0,52 <sup>**</sup>	-	-
палочкодерные	14,67±0,42 <sup>*</sup>	16,93±1,21 <sup>**</sup>	0,33±0,18	0,44±0,24
сегментоядерные	54,0±2,99 <sup>*</sup>	14,11±1,87 <sup>**</sup>	35,89±3,22	39,0±2,27
Лимфоциты	28,78±2,90 <sup>*</sup>	39,78±2,04 <sup>**Δ</sup>	62,67±3,38	59,11±2,16
Моноциты	0,89±0,26	13,29±0,71 <sup>**Δ</sup>	0,67±0,24	1,0±0,17

Таблица 3

**Изменения относительной площади структурно-функциональных зон подвздошного лимфатического узла мышей**

Структурно-функциональные зоны лимфоузла	Опытная группа (n = 9)		Контрольная группа (n = 9)	
	2 мес	11 мес	2 мес	11 мес
Герминативный центр вторичных лимфоидных узелков	0,81±0,07 <sup>*</sup>	0,15±0,03 <sup>**Δ</sup>	2,86±0,11	1,04±0,07
Мантий вторичных лимфоидных узелков	1,13±0,11 <sup>*</sup>	0,37±0,04 <sup>**Δ</sup>	3,41±0,07	2,82±0,20
Вторичные лимфоидные узелки	1,94±0,19 <sup>*</sup>	0,52±0,08 <sup>**Δ</sup>	6,21±0,11	3,86±0,23
Первичные лимфоидные узелки	1,15±0,07 <sup>*</sup>	0,41±0,06 <sup>**Δ</sup>	1,83±0,15	2,29±0,18
Корковое плато	0,90±0,09 <sup>*</sup>	0,63±0,07 <sup>**</sup>	1,75±0,10	3,34±0,17
Паракортикальная зона	29,30±1,15 <sup>*</sup>	21,76±0,92 <sup>**Δ</sup>	23,71±1,10	40,10±1,63
Мозговые тяжи	43,15±1,21	48,72±1,44 <sup>**Δ</sup>	40,10±0,37	31,79±1,08
Мозговые синусы	21,35±0,42 <sup>*</sup>	26,81±1,3 <sup>**Δ</sup>	23,83±0,67	16,50±0,42
Краевой синус	0,89±0,07	0,11±0,02 <sup>**Δ</sup>	0,65±0,10	0,54±0,05
Капсула	1,27±0,09 <sup>*</sup>	0,53±0,05 <sup>**Δ</sup>	1,82±0,06	1,39±0,08
Трабекулы	0,03±0,01	0,50±0,07 <sup>**Δ</sup>	0,05±0,02	0,21±0,06
В-зона	47,15±2,3	50,28±2,75	49,93±1,95	41,28±2,51
Корковое вещество	33,30±2,32	23,32±1,56 <sup>**Δ</sup>	33,57±1,37	49,56±2,33
Мозговое вещество	64,50±3,50	75,53±4,28 <sup>**</sup>	63,89±1,32	48,30±1,53
Корково-мозговой индекс	0,52±0,03	0,31±0,02 <sup>**Δ</sup>	0,53±0,02	1,03±0,05

Количество лейкоцитов в опытной группе через 2 месяца уменьшилась в 1,95 раза по сравнению с контролем. При исследовании через 11 месяцев количество лейкоцитов увеличилось до  $5,12 \cdot 10^3 \pm 0,74$ . Разница с контрольными значениями недостоверна.

В лейкограмме животных опытной группы через 2 месяца появились юные клетки, что свидетельствует об интенсивном пролиферативном процессе в организме мышей (табл. 2). Количество нейтрофилов достоверно увеличилось по сравнению с контролем в 2 раза, при этом отмечается дегенеративный сдвиг влево (индекс сдвига 0,3), а количество лимфоцитов уменьшилось в 2,2 раза по сравнению с контролем.

Дальнейшее наблюдение за показателями мышей опытной группы показало, что к 11 месяцам количество юных клеток в лейкограмме уменьшилось до 0,78%. При этом на фоне восстановления

количества лейкоцитов, близкого к контрольным значениям в лейкограмме, отмечаются нейтропения, увеличение дегенеративного сдвига до 1,3, лимфоцитопения, моноцитоз и эозинофилия.

Морфологические исследования подвздошных лимфатических узлов мышей через 2 месяца после начала эксперимента у животных опытной группы показали, что площадь коркового и мозгового вещества практически не отличается от таковых у контрольных животных и составляет 33,3 и 64,5% соответственно (табл. 3). При этом площадь первичных и вторичных лимфоидных узелков коркового вещества опытной группы уменьшалась по сравнению с контролем (как за счет герминативных центров – в 3,5 раза, так и за счет мантийной зоны – в 3 раза), а площадь паракортикальной зоны, наоборот, увеличивалась на 5,59%.

Через 11 месяцев в опытной группе отмечалось уменьшение относительной площади коркового вещества в 2,1 раза при увеличении мозгового на 27,2% по отношению к контрольной группе. В структуре коркового вещества уменьшалась площадь первичных узелков в 5,6 раза и вторичных узелков в 7,4 раза (по сравнению с контролем); а также по сравнению с опытной группой в 2 месяца площадь первичных и вторичных узелков в 2,8 и 3,7 раза соответственно. В опытной группе к 11-му месяцу наблюдений увеличилась площадь мозговых тяжей по сравнению с контролем на 16,9 и 5,57% по сравнению с опытной группой в 2 месяца. Также наблюдалось увеличение мозговых синусов на 10,3% по сравнению с контролем и на 5,46% по сравнению с опытной группой в 2 месяца.

При исследовании клеточного состава лимфатических узлов опытной и контрольной групп животных через 2 месяца мы наблюдали, что в герминативных центрах опытной группы происходит увеличение числа митотически делящихся клеток и бластных форм в 2,7 раза по сравнению с контролем, нейтрофилов – в 3,2 раза. В мозговых тяжях количество митозов увеличилось в 3 раза по сравнению с контролем, плазмобластов и нейтрофилов – в 1,5 раза. В мозговых синусах отмечалось увеличение количества зрелых и незрелых плазмочитов и уменьшение – малых лимфоцитов и нейтрофилов по сравнению с контролем.

Через 11 месяцев в герминативных центрах лимфатических узлов животных опытной группы по сравнению с контролем увеличилось количество бластных форм на 2,8%, митозов – в 3 раза. По сравнению с опытной группой в 2 месяца на более поздних сроках исследования в герминативных центрах увеличилось количество митозов в 1,7 раза, макрофагов – в 2,5 раза. В паракортикальной зоне лимфатических узлов через 11 месяцев увеличилось количество средних лимфоцитов в 7,7 раза, а малых лимфоцитов – уменьшилось на 25,8% по сравнению с контрольными значениями. Отмечается значительное увеличение количества лимфобластов (в 14,5 раза), макрофагов (в 5,5 раза) и нейтрофилов (в 2,4 раза). Количество ретикулярных клеток по сравнению с контрольной группой увеличилось в 2,1 раза. По отношению к показателям опытной группы в 2 месяца в отдаленные сроки наблюдалось уменьшение количества лимфобластов в 1,7 раза и достоверное увеличение количества макрофагов и ретикулярных клеток (в 4,7 и 1,5 раза соответственно).

В мозговых тяжях лимфатических узлов мышцей опытной группы по сравнению с контролем к 11-му месяцу наблюдения увеличилось количество средних лимфоцитов, незрелых плазмочитов, плазмобластов, макрофагов и нейтрофилов, а также ретикулярных клеток и митозов. Динамика клеточного состава этой зоны в опытной группе выражалась в увеличении количества средних лимфоцитов на 3,92%, макрофагов – в 2,6 раза, ретикулярных клеток – в 1,4 раза и уменьшение количества малых лимфоцитов и зрелых плазмобластов на 4,98 и 4,27% соответственно.

В отдаленные сроки наблюдения в мозговых синусах мышцей опытной группы вирус лейкоза Раушера вызывает увеличение количества зрелых плазмочитов, плазмобластов, макрофагов и нейтрофилов по сравнению с контролем. Изучение динамики клеточного состава мозговых синусов опытной группы на более позднем сроке наблюдения показало достоверное уменьшение количества средних и малых лимфоцитов, увеличение в 1,4 раза количества плазмобластов, в 3,4 раза – макрофагов, на 1,12% – ретикулярных клеток. Наблюдали также увеличение количества нейтрофилов в 3,38 раза и тучных клеток в 3,8 раза по сравнению с этой же группой на 2-м месяце исследования.

## ВЫВОДЫ

1. Развитие хронического вирусиндуцированного лейкоза Раушера у мышцей линии BALB/c характеризуется нарастающей эритропенией, снижением количества лейкоцитов через 2 месяца после инфицирования и нормализацией последних к 11-месячному периоду наблюдения. Динамика показателей лейкограммы зараженных мышцей характеризуется нейтрофилией, увеличением дегенеративного сдвига влево, эозинофилией и моноцитозом.
2. Через 2 месяца после начала эксперимента морфофункциональные изменения подвздошного лимфатического узла характеризуются уменьшением транспортной функции, увеличением пролиферативной активности лимфоидных клеток под действием антигена, активацией обменных процессов в клетках В-зоны лимфатического узла, реализующего иммунный ответ.
3. В отдаленные сроки (11 месяцев) после начала эксперимента в опытной группе происходит угнетение иммунного ответа, усиление транспортной функции подвздошного

лимфатического узла и снижение функции гуморального иммунного ответа. Изменения клеточного состава герминативных центров

(увеличение бластных форм, митозов) свидетельствуют о процессах пролиферации, происходящих под действием антигена.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Бортникова В. В., Крепикова Л. В., Татаурова Т. А.* Изучение иммуномодулирующего действия противовирусного препарата Хелепина или Хелепина Д/Сб. материалов XVII Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». – М., 2010. – С. 583.
2. *Бородин Ю. И.* Проблемы лимфодетоксикации и лимфосанации // Проблемы экспериментальной, клинической и профилактической лимфологии: материалы междунар. симпоз. – Новосибирск, 2000. – С. 5–9.
3. *Lian R. H., Kumar V.* Murine natural killer cell progenitors and their requirements for development // *Immunology*. – 2002. – N14. – P. 453–460.
4. *Смирнова О. В., Манчук В. Т.* Особенности клеток иммунной системы при остром лимфобластном лейкозе // *Медицинская иммунология*. – 2013. – Т. 15, № 6. – С. 577–584.
5. *Смирнова О. В., Савченко А. А., Манчук В. Т.* Клинико-иммунологическое состояние больных в зависимости от стадии острого нелимфобластного и острого лимфобластного лейкозов // *Сиб. мед. журн.* – 2008. – Вып. № 3–1, т. 23. – С. 34–39.
6. *Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований* / З. К. Бландова, В. А. Душкин, А. М. Малашенко, Е. Ф. Шмидт. – М.: Наука, 1983. – С. 54–59.
7. *Каркищенко В. Н., Шмидт Е. Ф., Брайцева Е. В.* Исследователи предпочитают мышей BALB/c // *Биомедицина*. – 2007. – № 6. – С. 57–70.
8. *Науменко О. И., Николаенко Н. И., Бутенко З. А.* Ультраструктурная и функциональная характеристика клеток субэндоствольной области костного мозга при вирусном лейкозогенезе // *Стволовая клетка в норме и при патологии: материалы Всесоюз. конф. с междунар. участием* / под ред. Е. Д. Гольдберг, В. А. Козлова. – Томск, 1988. – С. 8–9.
9. *Индукция резистентности к лейкомогенному действию ретровируса Раушера у генетически чувствительных мышей линии BALB/c иммунизацией аутоантителами против антигенов гистосовместимости H-2<sup>d</sup>* / В. С. Тер-Григоров, О. Е. Ягужинская, З. Х. Мамяляева [и др.] // *Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований: тез. всесоюз. конф.* – М., 1988. – ч. 1. – С. 140–141.
10. *Особенности проявления инфекционного (лейкозно- туберкулезного) процесса в экспериментальном варианте* / С. Н. Магер, П. Н. Смирнов, А. С. Донченко [и др.] // *Тез. докл. III Всесоюз. конф. по эпизоотологии* (Новосибирск, 24–26 сент. 1991 г.). – Новосибирск, 1991. – С. 106–107.
11. *Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики Российской Федерации»* [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <http://poisk-zakona.ru/125918.html>.
12. *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. – LAR publication, National Academy Press, 1996.
13. *Степенова О. И.* Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей // *Биомедицина*. – 2006. – № 2. – С. 137–139.
14. *Лабораторные методы исследования в клинике: справ.* / под ред. В. В. Меншикова. – М., 1987. – С. 310–311.
15. *Волкова С. В., Елецкий Б. К.* Основы гистологии и гистологической техники. – М.: Медицина, 1971. – С. 242–253.
16. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника. – М.: Иностран. лит., 1954. – 718 с.
17. *Афанасьева Ю. И., Юрина Н. А., Алешин Б. В.* Гистология. – М.: Медицина, 1989. – С. 429–435.
18. *Малофеев Ю. М., Чебаков С. Н.* Морфология системы крово-лимфообращения у животных. – Барнаул: Изд-во АГАУ, 2000. – С. 129–131.
19. *Раковщик А. Л., Гриф С. Л., Чурилова Н. И.* Морфофункциональная гетерогенность фагоцитирующих клеток маргинальной зоны и красной пульпы селезенки мышей // *Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии*. – Томск, 2002. – Вып. 2. – С. 248.

**RAUSCHER LEUCOSIS VIRUS EFFECT ON HEMATOLOGICAL INDEXES  
AND MORPHOLOGY OF LYMPHATIC NODES IN EXPERIMENTAL MICE OF LINE BALB/C**

**Yu. L. Rusakova, S. N. Mager, V. V. Khramtsov**

*Key words:* hematologic, morphologic, immunologic changes, experimental Rauscher leucosis, germinative centers, paracortical zone of lymphatic nodes

*Summary. The paper shows the dynamics of differences in hematologic indexes, changes in the structure and cytoarchitectonics of iliac lymphatic node in mice infected with Rauscher leucosis virus. It is established that the progress of virus-induced chronic Rauscher leucosis in experimental mice of line BALB/c is characterized by increasing erythropenia, leucopenia and normalized count of leukocytes in the terminal stage of the disease. The leukograms of infected mice indicate the increased number of neutrophils, eosinocytes, monocytes; degenerative shift of neutrophil nuclei to the left is expressed. Morphological examinations allowed to identify that during the hyperplastic period of the disease progress cytoarchitectonics of iliac lymphatic node is characterized by reduced transport function, increased proliferative activity of lymphoid cells exposed to antigen, activated exchange processes in the cells of B-zone of the lymphatic node that realizes immune response. In the terminal stage of the disease morphometry of lymphatic nodes in the experimental group largely changes, the transport function of the iliac lymphatic node becoming stronger and its non-specific humoral immunologic reactivity going down. Cell composition of germinative centers alters, at the same time the number of blast shapes and mitoses increases, which testifies to processes of proliferation taking place when exposed to antigen.*