

Для цитирования: Надточей, Г.А. Патоморфологические изменения при скрепи у овец: световая и электронная микроскопия / Г.А. Надточей, С.В. Вангели, В.В. Стаффорд // Российский ветеринарный журнал. — 2019. — № 6. — С. 9–13. DOI: 10.32416/2500-4379-2019-6-9-13
 УДК 619: 616.9: 616-091.8
 For citation: Nadtochey G.A., Vangeli S.W., Stafford V.V., Path-morphological alterations in sheep with scrapie: light and electron microscopy, Rossijskij veterinarnyj zhurnal (Russian veterinary journal), 2019, No. 6, pp. 9–13. DOI: 10.32416/2500-4379-2019-6-9-13

Патоморфологические изменения при скрепи у овец: световая и электронная микроскопия

Г.А. Надточей, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии (g_a_nadtochey@mail.ru).

С.В. Вангели, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии (sergeyvangeli@mail.ru).

В.В. Стаффорд, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник сектора патоморфологии.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (109428, РФ, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1).

Скрепи на территории России регистрируется в виде спорадических случаев с начала 1980-х годов у овец романовской породы. Однако свойства циркулирующего возбудителя скрепи не описаны. В случае заноса на территорию страны возбудителя ГЭП КРС, к которому чувствительны овцы, он может ошибочно проходить под диагнозом скрепи, в то время как он представляет экономическую и социальную опасность.

Цель исследования. Изучить патоморфологические и субмикроскопические изменения в тканях головного мозга овец при экспериментальной инфекции штаммом скрепи, выделенным от овец романовской породы.

Материалы и методы. В работе использовали штамм ВТ-91 скрепи, выделенный от больной овцы романовской породы. Опыт провели на 8 ягнятах породы меринос. Заражали животных орально частично очищенным гомогенатом тканей головного мозга больной скрепи овцы. Патогистологические изменения в ткани головного мозга изучали общепринятыми методами световой и электронной микроскопии.

Результаты. Инкубационный период в среднем был равен 568 дням. Клинические симптомы болезни были типичными для поражения ЦНС. Патогистологические изменения на уровне световой микроскопии характеризовались как спонгиозная энцефалопатия. Ультраструктурные изменения в тканях головного мозга были в виде массового формирования в цитоплазме нервных клеток мультивезикулярных структур, аутофагосом, изменения мембранных структур и дистрофии клеточных органелл.

Заключение. Штамм ВТ-91 вызывает у овец клинические симптомы болезни и гистопатологические изменения в ЦНС, характерные для скрепи классического типа.

Ключевые слова: овцы, скрепи, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, прион, гистопатология, электронная микроскопия.

Path-morphological alterations in sheep with scrapie: light and electron microscopy

G.A. Nadtochey, PhD in Biology sc., head of Laboratory of molecular cytopathology and electron microscopy (g_a_nadtochey@mail.ru),

S.W. Vangeli, PhD in Veterinary sc., senior researcher of the Laboratory of molecular cytopathology and electron microscopy (sergeyvangeli@mail.ru),

V.V. Stafford, PhD in Biology sc., senior research fellow at the Department of pathomorphology.

Federal Research Center — All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences (24-1, Ryazanskyy prospect str., Moscow, RF, 109428).

In Russia sporadic cases of scrapie in sheep of Romanov breed registered from the beginning of 1980s. However the scrapie agent characteristics have not been studied. In case the BSE agent is introduced into Russia it may be recognized as sheep scrapie, while the BSE agent is very dangerous from social and economic points of view.

The purpose of investigations. To study path-morphological and submicroscopic changes in ovine brain tissues in experimental infections with scrapie agent (BT-91 strain) isolated from Romanov sheep.

Materials and methods. The BT-91 strain isolated from a Romanov sheep was used in our experiments. Eight merinos lambs were used. The animals were orally infected with partially purified brain homogenate from a sheep with scrapie. Pathological changes in the brain tissues were studied using routine methods of light and electron microscopy.

Results. The incubation period was on average 568 days. The clinical symptoms were typical of CNS infection. Pathologistological changes were seen as spongiform encephalopathy in light microscopy. Ultrastructural changes in the brain tissues were seen as mass formations in the nerve cell cytoplasm multivesicular structures, autophagosomes, membrane changes, and dystrophy of cell organelles.

Conclusion. The BT-91 strain causes clinical symptoms and histopathological changes in the CNS of sheep typical to classical scrapie.

Keywords: sheep, scrapie, bovine spongiform encephalopathy, prion, histopathology, electron microscopy.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России по государственному заданию № 0578-2015-0002. Авторы не имеют конфликта интересов.

Сокращения: ГЭП КРС — губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, ТГЭ — трансмиссивная губкообразная энцефалопатия, ЦНС — центральная нервная система

Введение

Скрепи относится к группе ТГЭ — инфекционных болезней человека и животных, характеризующихся длительным инкубационным периодом, сходными нейрологическими расстройствами, вакуолизацией нейропаренхимы, накоплением в ней патогенной изоформы прионного белка, отсутствием иммунологического ответа на возбудитель и неизбежным летальным исходом. Естественная скрепи установлена у овец, коз и муфлонов. Распространена болезнь практически во всех странах мира, кроме Австралии и Новой Зеландии [1]. На территории Российской Федерации скрепи регистрируется с начала 1980-х годов у овец романовской породы, хотя отдельные случаи болезни с подозрением на скрепи специалистами отмечались и ранее. Однако штаммы возбудителя скрепи, циркулирующего на территории страны, не выделяли, в то время как за рубежом описано свыше десятка штаммов, отличающихся по ряду биологических свойств. Овцы и козы, инфицированные скрепи, в течение инкубационного периода, длящегося в среднем 4,5 года, выделяют возбудителя в окружающую среду с мочой, калом и слюной [3]. Учитывая, что прионы являются чрезвычайно устойчивыми возбудителями, они могут сохраняться в окружающей среде многие годы [4, 5] и служить источником инфекции. Так как в течение инкубационного периода животные выглядят абсолютно нормальными, после убоя полученное от них сырье может использоваться без ограничений, и поэтому прион скрепи потенциально выступает опасным контаминантом пищевых продуктов и ряда продуктов фармацевтической и биологической промышленности, изготовленных с использованием данного сырья.

В последние годы внимание зарубежных специалистов привлекла вторая прионная инфекция мелкого рогатого скота — ГЭП КРС. Инфекция впервые была зарегистрирована в Великобритании в 1986 г [6], однако вскоре распространилась на ряд стран. В странах Европы было зарегистрировано 183700 клинических случаев этой инфекции, 21 случай в Канаде, 4 в США, 2 в Бразилии, 1 в Израиле и 81 в Японии. Прион ГЭП КРС при алиментарном пути заражения может преодолевать межвидовой барьер. Естественные инфекции его установлены у людей, многих видов семейств полорогих и кошачьих. Главным источником распространения инфекции послужила зараженная мясокостная мука, изготовленная с использованием туш инфицированных животных.

Зараженная мясокостная мука интенсивно использовалась в кормах для КРС в странах Европейского союза и некоторых других странах для повышения прироста массы тела и надоев молока; она могла попадать также в корма овец и коз. Экспериментальное заражение овец и коз прионом ГЭП КРС показало, что эти животные чувствительны к данному возбудителю и, более того, прион, проходя пассаж через их организм, становится более вирулентным [7]; по клинической картине и гистологии болезнь не отличается от естественного

скрепи. Учитывая зооантропонозность приона ГЭП КРС для людей, Евросоюз и другие страны усилили исследования случаев скрепи овец и коз, и естественная инфекция у коз подтвердилась [8, 9].

ГЭП КРС на территории России не установлена, но исключать заноса ее в РФ нельзя, учитывая широкие экономические связи со странами, в которых эта инфекция регистрировалась. Так, в период с 2008 по 2017 г. включительно из этих стран в Россию было завезено 437361 голова КРС, 618 оленей и 5251 голова мелкого рогатого скота. Практических методов выявления животных, находящихся в инкубационном периоде, при прионных инфекциях нет, а он может длиться свыше 10 лет. Изложенные данные в целом свидетельствуют, что контроль прионных инфекций и изучение штаммов прионов, циркулирующих в популяции животных на территории страны, являются актуальными проблемами в связи с их экономической и социальной значимостью.

Цель исследования

Изучить патоморфологические и субмикроскопические изменения в тканях головного мозга овец при экспериментальной инфекции штаммом скрепи, выделенным от овец романовской породы.

Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии ФГБНУ ВИЭВ и опытной базе Вышневолоцкого филиала ВИЭВ. В работе использовали штамм ВТ-91 возбудителя скрепи, выделенного от овцы романовской породы [10]. Штамм прошел три пассажа на овцах и хранился до использования при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в виде 10%-го (вес/объем) гомогената головного мозга больной скрепи овцы в стерильном забуференном физрастворе, содержащем 2 % сахарозы. В опыте использовали 8 трехмесячных ягнят породы меринос из хозяйства, в котором в последние 5 лет не регистрировали заболеваний с нейрологическими клиническими признаками. Пяти ягням скормили по 50 мл разведенного 1:1 питательной средой 199 штамма ВТ-91, трем ягням скормили по 50 мл среды 199, содержащей аналогичное количество гомогената головного мозга здоровой овцы, они служили контролем и содержались отдельно от зараженных. За животными вели ежедневное клиническое наблюдение.

Для гистопатологического анализа пробы тканей различных отделов головного мозга фиксировали 10%-м нейтральным формалином. Препараты готовили стандартным методом: обезвоживали в батарее спиртов, заключали в парафин, изготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронной микроскопии образцы тканей фиксировали 2%-м раствором глутарового альдегида на какодилатном буфере, затем 1,33%-м раствором OsO_4 в коллидиновом буфере и после обезвоживания в батарее спиртов заключали в смесь Эпона 812 и аралдита М. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме (LKB) стеклянными ножами, контрастировали их 2%-м раствором ацетата урана и затем 0,4%-м раствором цитрата свинца. Анализ препаратов проводили в электронном микроскопе JEM 100СХ III при напряжении 80 KV и инструментальных увеличе-

ниях от 5 до 50 тысяч. Документировали результаты на фотопленку (Agfa, art. № EB 19H).

Пробы тканей органов от всех живых животных брали после эвтаназии, проведенной под наркозом. От трех овец (две подопытные и одна контрольная) пробы взяли на стадии развитых клинических признаков, от двух — на терминальной стадии и одновременно от одной контрольной, а от двух (подопытная и контрольная) — через два месяца после падежа двух подопытных овец.

Результаты

Первые клинические признаки заболевания появились у одной овцы через 488 дней, последнее животное заболело через 639 дней после заражения. В среднем инкубационный период (488, 547, 578, 588 и 639 дней) составил 568 дней. У всех животных болезнь развивалась примерно в одинаковой последовательности. Первое, что обратило на себя внимание, это появление настороженности, боязни: животные становились пугливыми, затем отмечали сильную возбудимость, повышенную реакцию на звук и прикосновение. Шерсть становилась матовой, нарушалась симметричность ушей вплоть до их обвислости. Развивался тремор отдельных групп мышц и головы, нарушалась координация движения при ходьбе, животные часто спотыкались. Больные животные все чаще залеживались. У двух животных, заболевших первыми, развились парезы передних конечностей; через 2 месяца от начала болезни они пали. У всех больных животных в течение всего опыта сохранялся аппетит, но они медленно худели; температура тела была в пределах физиологической нормы.

При патологоанатомическом обследовании павших и убитых больных животных отмечали негативное изменение их внешнего вида, матовость волосяного покрова и заметное в разной степени истощение; у павших животных отмечено отсутствие жировых отложений в подкожной клетчатке, сердечной сорочке и сальнике. Внутренние органы были в норме, но селезенка у всех больных животных была мягкая, тургор ткани был снижен.

Контрольные животные, подвергнутые эвтаназии, выглядели нормально, были средней упитанности. Внутренние органы отклонений от нормы не имели.

Гистологическое изучение различных отделов головного мозга контрольных животных выявило характерное строение ткани, в которой можно было видеть в сером веществе нейрональные клетки, причем в ядрах нервов были крупные нейроны (рис. 1), аксоны, дендриты, клетки глии; в белом веществе — аксоны, волокнистые астроциты и клетки олигодендроглии. В срезах тканей всех отделов в нейропиле рассеяны мелкие неправильной формы светлые пространства, представляющие собой пустоту вследствие вымывания в фиксаторе и спиртах растворимых веществ и липидных компонентов миелина. Ни в одном срезе не было выявлено вакуолей в нейронах.

В срезах тканей головного мозга подопытных животных характерные для скрепи изменения обнаружены в продолговатом мозге, варолиевом мосту, мозжечке, четверохолмии, гипоталамусе, аммониевом роге и в слоях малых и больших пирамид коры. Принципиально характер патологических изменений в различных

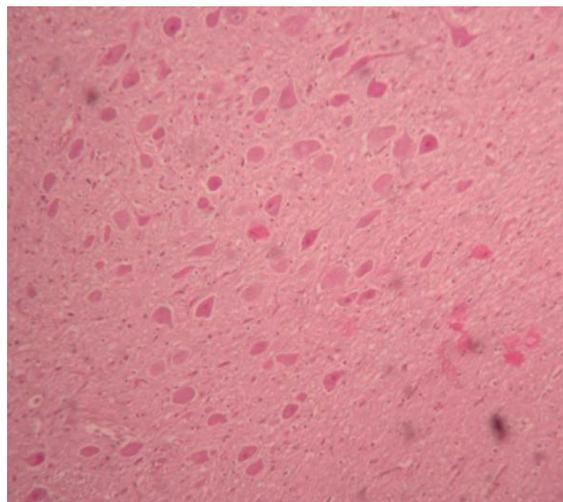


Рис. 1. Стволовая часть головного мозга на уровне задвижки. Дорсальное ядро блуждающего нерва контрольной овцы, видны многочисленные нормальные нейроны. Г&Э, x200

Fig. 1. The stem of the brain at the level obex. The dorsal nucleus of the vagus nerve. Numerous normal neurons are seen. H&E staining, x200

отделах касался только степени их тяжести. Наиболее яркая патология характеризовалась вакуолизацией нейронов и нейропиля, выпадением нервных клеток, в результате чего мозг приобретал губкообразную структуру. При вакуолизации нейроплазмы нейроны, как правило, увеличивались в размерах и приобретали различную форму: кольцеобразную, овальную или теннисной ракетки (рис. 2), а при полной дистрофии нейронов или других клеток на их месте в нейропиле образовывалась четко отграниченная круглая вакуоль соответствующего размера. При частичной дистрофии остатки нейроплазмы были видны в виде фрагментов различных размеров у клеточной оболочки. У части нейронов патологические изменения проявлялись в виде диффузного или очагового распыления вещества нейроплазмы. В отдельных клетках цитоплазма имела неоднородный вид. Во многих срезах были видны

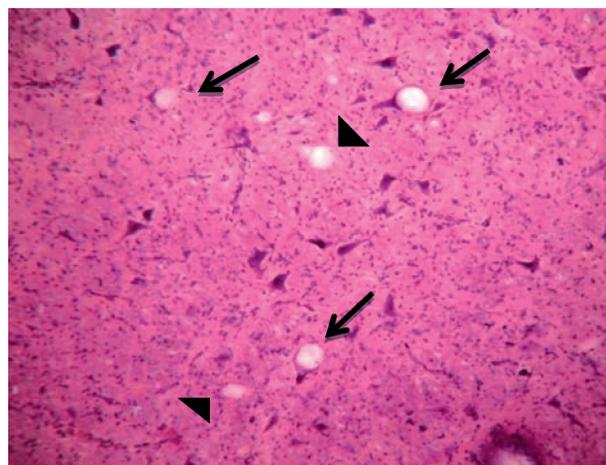


Рис. 2. Микропрепарат: зараженная скрепи овца. Четко видны признаки спонгиозной энцефалопатии в коре головного мозга: вакуолизация нейронов (стрелка) и нейропиля (▲). Г&Э, x220

Fig. 2. Micro-preparation: scrapie-infected sheep with clear signs of spongiform encephalopathy in the brainstem at the level of the obex: vacuolation of neurons (arrow) and in the neuropil (▲). H&E staining, x220

пикноморфные нейроны, которые были сморщены, удлинены; их тела и апикальные дендриты были сильно окрашены и их структура не просматривалась (см. рис. 2). В ядрах некоторых нейронов была видна конденсация хроматина или его частичное растворение, в результате чего хроматин имел вид грубой сети, у части нейронов ядра не были видны, видимо, в результате их полного хроматолиза.

В печени, почках и легких у подопытных и контрольных животных морфологических изменений не выявили. В селезенке подопытных животных лимфоидные фолликулы, в отличие от селезенки контрольных животных, в подавляющем большинстве были без светлых центров. В лимфоузлах средостения и подколенной складки всех животных отклонений от нормы не выявили.

Субмикроскопический анализ тканей головного мозга подопытных животных выявил сложные патологические изменения в структурах органелл всех клеток. Цитоплазма нейронов имела электронносветлые области очагового набухания, в которых отсутствовали органеллы, но выявлялся тонкий гранулярный компонент и мелкие везикулы (рис. 3), остальная часть цитоплазмы содержала различных форм и размеров везикулярные структуры (рис. 4) и клеточные органеллы. Везикулярные структуры в большинстве формировались эле-

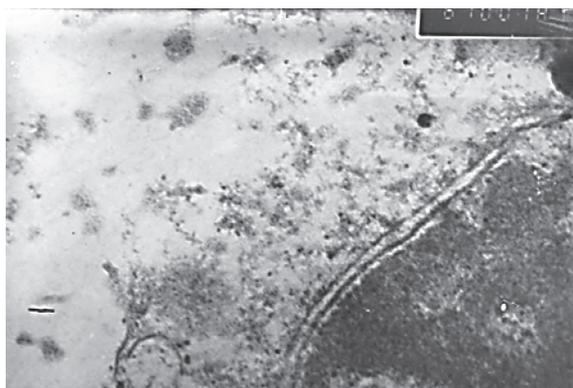


Рис. 3. Фрагмент нейрона. В цитоплазме виден гранулярный компонент и мелкие везикулы. Хроматин ядра уплотнен. Перинуклярное пространство расширено. Полоса = 400 нм

Fig. 3. A part of neuron. A granular component and small vesicles are seen in the cytoplasm. The nuclear chromatin is dense (dark); the perinuclear space is widened. Bar=400 nm

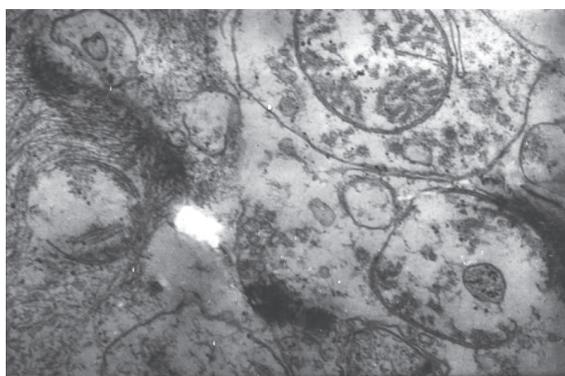


Рис. 4. Фрагмент нейрона. В цитоплазме везикулярные структуры и аутофагосомы, содержащие митохондрии с деструкцией крист. Видны скопления нейрофиломентов. Полоса = 400 нм

Fig. 4. A part of neuron. In cytoplasm vesicular structures and autophagosomes containing mitochondria with destructed cristas are seen. There are mass of neurophiloments. Bar=400 nm

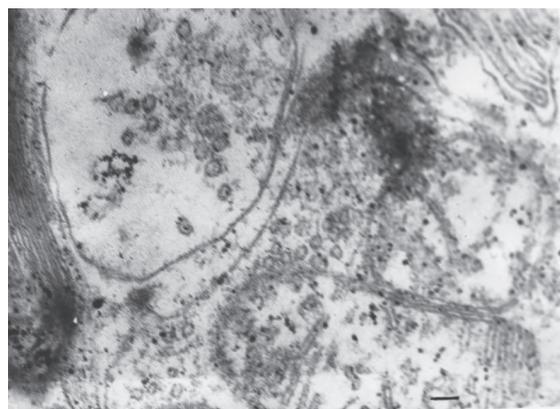


Рис. 5. Пресинаптическое окончание дендрита. Видны синаптические пузырьки, дегенерирующие митохондрии и фрагмент аппарата Гольджи. Полоса = 500 нм

Fig. 5. A presynaptic terminal of a dendrite. Synaptic bubbles, degenerating mitochondrias, and Golgi apparatus are observed. Bar=500 nm



Рис. 6. Фрагмент аксона. Видно скопление дегенерирующих митохондрий, окруженное элементарной мембраной и миелиновым чехлом, а также миелинизированные нервные волокна в стадии дегенерации. Полоса = 200 нм

Fig. 6. A part of axon. A accumulation of degenerating mitochondrias surrounded with a unit membrane and a myelin cheath is observed as well as a degenerating myelin nerve. Bar=200 nm

ментарными трехслойными мембранами и содержали мелкие везикулы, гранулярный компонент различной плотности, а иногда и дегенерирующие митохондрии с четко выраженной деструкцией крист (см. рис. 4). Дегенерирующие митохондрии с деструкцией крист выявляли также в пресинаптических окончаниях дендритов (рис. 5) и аксонах, в которых часто их скопления окружены кроме элементарной мембраны также миелиновым чехлом (рис. 6), рядом сохранялись миелиновые футляры, содержащие вакуоли с дегенерирующим содержимым, а также паракристаллические скопления миелиновых мембран, гранулярного и фибриллярного компонентов, мелких везикул. Миелиновые мембраны во многих структурах расширяются и фрагментируются (рис. 6), в отдельных местах слои миелина сливаются в электронноплотные конгломераты, в которых слои мембран не различаются. В нейроплазме постоянно встречаются зоны формирования аутофагосом (рис. 7), когда элементарной мембраной окружается участок цитоплазмы или органоид клетки и формируется аутофагосома, приводящая к лизису секвестрированного материала.

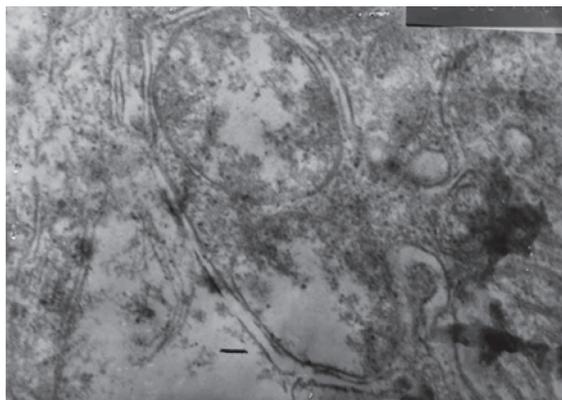


Рис. 7. Фрагмент цитоплазмы нейрона с формирующейся аутофагосомой. Полоса = 220 нм

Fig. 7. A part of neuroplasma with a forming autophagosome. Bar=220 nm

В некоторых дендритах выявляются скопления мелких частиц, имеющих в поперечном срезе кольцевидный вид и диаметр 25...35 нм и на продольном срезе длину 100...150 нм (рис.8).

Заключение

Штамм ВТ-91 вызывает у овец клинические симптомы болезни и гистопатологические изменения в ЦНС, характерные для скрепи классического типа.

Конфликт интересов

Авторы статьи не имеют финансовых или личных отношений с другими лицами или организациями, которые могли бы повлиять на достоверность или содержание этой работы.

Прозрачность финансовой деятельности

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

References

1. Detwiler L.A., Baylis M., The epidemiology of scrapie, *Rev Sci Tech.*, 2003 Apr, No. 22(1), pp. 121-143. DOI: 10.20506 / rst.22.1.1386.
2. John T.R., Schätzl H.M., Gilch S., Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay, *Prion*, 2013 May-Jun; No. 7(3), pp. 253-258. DOI: 10.4161/pri.24430.

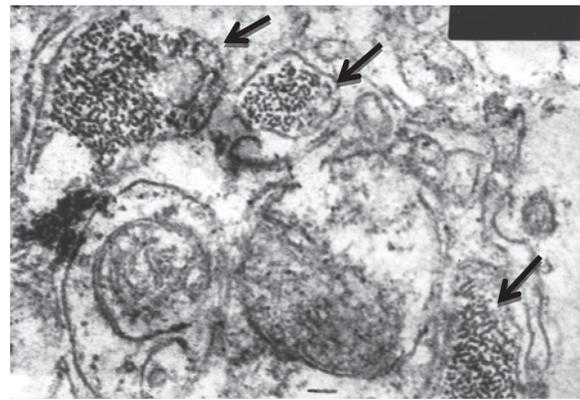


Рис. 8 Фрагмент аксона содержит везикулы, аутофагосому и скопление тубуловезикулярных структур (стрелка). Полоса = 220 нм

Fig. 8. A part of axon containing vesicles, autophagosome, and masses of tubulovesicular structures (arrow). Bar=220 nm

3. Mathiason C.K., Powers J.G., Dahmes S.J, Osborn D.A, Miller K.V., Warren R.J., Mason G.L., Hays S.A., Hayes-Klug J., Seelig D.M., Wild M.A., Wolfe L.L., Spraker T.R., Miller M.W., Sigurdson C.J., Telling G.C., Hoover E.A., Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease, *Science*, 2006 Oct, Vol. 6, No. 314(5796), pp. 133-136. DOI: 10.1126/science.1132661.
4. Georgsson G., Sigurdarson S., Brown P., Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years, *J Gen Virol.*, 2006 Dec, No. 87(Pt 12), pp. 3737-3740. DOI: 10.1099/vir.0.82011-0.
5. Johnson C.J., Pedersen J.A., Chappell R.J., McKenzie D., Aiken J.M., Oral transmissibility of prion disease is enhanced by binding to soil particles, *PLoS Pathog.*, 2007 Jul, No. 3(7), e93. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030093.
6. Wells G.A., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.D., Hancock M., Dawson J.M. and Bradley R., A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle, *Vet Rec.*, 1987, No. 121, pp. 419-420. DOI: 10.1136/vr.121.18.419.
7. Plinston C., Hart P., Hunter N., Manson J.C, Barron R.M., Increased susceptibility of transgenic mice expressing human PrP to experimental sheep bovine spongiform encephalopathy is not due to increased agent titre in sheep brain tissue, *J Gen Virol.*, 2014 Aug, No. 95(Pt 8), pp. 1855-1859. DOI: 10.1099/vir.0.065730-0. Epub 2014 May 14.
8. Eloit M., Adjou K., Couplier M., Fontaine J.J., Hamel R., Lilin T., Messiaen S., Andreoletti O., Baron T., Bencsik A., Biacabe A.G., Beringue V., Laude H., Le Dur A., Vilotte J.L., Comoy E., Deslys J.P., Grassi J., Simon S., Lantier F., Saradin P., BSE agent signatures in a goat, *Vet Rec.*, 2005 Apr 16, No. 156(16), pp. 523-524. DOI: 10.1136/vr.156.16.523-b.
9. Spiropoulos J., Lockey R., Sallis R.E, Terry L.A, Thorne L., Holder T.M., Beck K.E., Simmons M.M., Isolation of prion with BSE properties from farmed goat, *Emerg Infect Dis.*, 2011 Dec, No. 17(12), pp. 2253-2261. DOI: 10.3201/eid1712.110333.
10. Nadtochey G.A, Shubin B.A., Vydelenie shtamma vzbuditelya skrepi ot ovec romanovskoj porody [The isolation of a scrapie strain from Romanov sheep], The 5th Russian National Congress «Man and Drugs». Abstracts of Papers. Moscow April, 21-25 1998, p.424.)In russ.).