

РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА

Дадаева А.А., Субботина Е.Л., Сизикова Л.П., Бакулина Л.Ф., Каткова Л.Р., Грицык О.Б.,
Малкова Е.М.

ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

п. Кольцово Новосибирской обл., Россия, 630559

malkova@vector.nsc.ru тел: 8-(383)-336-60-10

lexadad@mail.ru phone: 8-913-392-82-63

Резюме

Показано наличие большого числа митохондрий, высвободившихся из разрушенных вирусом Эбола (ВЭ) клеток, в крови, печени и костном мозге инфицированных ВЭ морских свинок. Митохондрии образуют многочисленные скопления, встречаются гипертрофированные митохондрии. Выдвинуто предположение, объясняющее превалирование активности аспаратаминотрансферазы (АСТ) над активностью аланинаминотрансферазы (АЛТ) у животных, инфицированных летальным штаммом ВЭ. Также выдвинуто предположение о роли митохондрий, высвободившихся из разрушенных ВЭ клеток, в процессе образования геморрагий в терминальную стадию инфекции. Показана роль фрагментов денатурированных белков в патогенезе лихорадки Эбола.

Ключевые слова: лихорадка Эбола, патогенез, митохондрии, белки.

MITOCHONDRIAS ROLE IN EBOLA FEVER PATHOGENESIS

Dadaeva A.A., Subbotina E.L. Sizikova L.P., Bakulina L.F., Katkova L.R., Gritsyk O.B.,
Malkova E.M.

FSRI SRI of virology and biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance on
Consumer Rights Protection and Human Well-being

Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, 630559

malkova@vector.nsc.ru phone: 8-(383)-336-60-10

lexadad@mail.ru phone: 8-913-392-82-63

Resume

The presence of large number of mitochondrias come out from destroyed by Ebola virus (EV) cells in blood, liver and bone marrow of infected with EV animals is shown. Mitochondrias formed numerous groups, megamitochondrias were met. Supposition explaining the prevalence of activity of aspartat aminotransferase (AST) above activity of alanin aminotransferase (ALT) in guinea pigs infected with lethal strain of EV is done. Also the supposition about role of mitochondrias come out from destroyed by EV cells in the forming of hemorrhages at the terminal stage of infection is formulated. The role of protein wastes is demonstrated.

Key words: Ebola fever, pathogenesis, mitochondrias, proteins.

Введение

Митохондрии являются основными поставщиками энергии для клетки, обеспечивая до 90 % всего синтезируемого клеткой АТФ [1]. Число, форма и величина митохондрий широко варьируют в различных клетках; в среднем диаметр митохондрий составляет 0,5-1 нм, длина - 2-5 нм. Помимо энергетического метаболизма, митохондрии участвуют в апоптозе, старении и многих других процессах. Дисфункции митохондрий вызывают нарушения во всем организме, приводящие у человека к серьезным последствиям, таким, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, рак, диабет второго типа, сердечно-сосудистая болезнь, остеоартриты и др. [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. По современным оценкам, протеом митохондрий млекопитающих может включать до 1000-2000 различных белков [9]. Все эти белки, кроме 10–13 субъединиц комплекса окислительного фосфорилирования, закодированных в митохондриальной ДНК, кодируются ядерной ДНК и доставляются в митохондрии посредством специальных транспортных механизмов [10].

Митохондрии в клетке делятся, двигаются, могут сливаться друг с другом, способны к быстрому изменению формы [1]. Различают следующие структурные изменения митохондрий: увеличение числа и размеров; образование мегамитохондрий (размер митохондрий может превышать размер ядра клетки); изменение формы; изменения структуры крист митохондрий, уплотнение матрикса, декструкция мембран [11]. Избыточное увеличение числа митохондрий в клетках (онкоциты, активно пролиферирующие клетки, клетки Гюртля и др.) можно наблюдать в оптическом

микроскопе, это проявляется появлением в цитоплазме клеток оксифильных гранул [11]. Мегамитохондрии формируются, например, в гепатоцитах при алкоголизме и циррозах печени, в эпителиальных клетках канальцев почек при нефротическом синдроме, дефиците рибофлавина, интоксикации бромидами, некоторых мышечных заболеваниях [11].

При такой очевидной важности митохондрий в функционировании клеток организма, в доступной нам литературе не обнаружено данных о характере изменений митохондрий (в клетках, вовлеченных в инфекционный процесс) при лихорадке Эбола, тяжелой инфекции с летальностью до 89 % [12, 13]. При этом известно, что лихорадка Эбола приводит к обширной гибели клеток печени, а каждый гепатоцит содержит значительное количество митохондрий. Целью настоящего исследования явилось изучение роли митохондрий, высвободившихся из разрушенных ВЭ клеток, в патогенезе лихорадки Эбола.

Материалы и методы

Работа выполнена в специализированных помещениях ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», предназначенных для работы с особо опасными вирусами (уровень BSL-4) в 1999-2004 гг.

В работе использовали: 1) Вирус Эбола (ВЭ), вид Заир Эбола вирус, штамм Заир, полученный из коллекции ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». У морских свинок данный штамм вызывает нелетальную инфекцию с температурной реакцией и последующим выздоровлением. Вирус прошел 2 пассажа на приматах и был наработан на культуре клеток Vero. Далее обозначен, как дВЭ (дикий штамм ВЭ). 2) ВЭ, вид Заир Эбола вирус, штамм К-5, адаптированный к морским свинкам и вызывающий у них летальное заболевание. Получен селективным пассированием дВЭ на морских свинках, как описано в [14, 15]. Далее обозначен, как адВЭ (адаптированный штамм ВЭ).

В работе использовали нелинейных морских свинок Hartley массой 200-250 г. Животных получали из вивария ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» и содержали на стандартном рационе. Все болезненные процедуры проводили под эфирным наркозом. Уход за инфицированными животными и работа с ними осуществлялись в условиях инфекционного вивария с уровнем биобезопасности BSL-4 (работа персонала в защитных костюмах «Антибелок-5») и с соблюдением рекомендаций, изложенных в [16].

Морским свинкам вводили внутрибрюшинно по 1 мл дВЭ и адВЭ (содержание вируса 10^3 БОЕ/мл). Ежедневно измеряли ректальную температуру. Взятие крови (от

каждой морской свинки отдельно) производили кардиальной пункцией. Для гематологических исследований использовали кровь с 2 %-ным раствором этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в соотношении 1:9 (одна часть коагулянта и 9 частей крови), из которой делали тонкие мазки на предметных стеклах. После взятия крови животных усыпляли, вскрывали, готовили образцы для определения содержания вируса (10 %-ный печеночный гомогенат), а также мазки-отпечатки печени и мазки костного мозга (из грудины). Мазки фиксировали в парах формалина в течение 2-х суток, окрашивали азур-II-эозином, изучали с использованием иммерсионного масла (объектив x100, окуляр x10). Материал забирали в 0-е сутки (фоновые показатели) и 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 9-е, 11-е, 15-е, 20-е сутки после инфицирования (от 4-х морских свинок из каждой группы). Группой контроля являлись интактные морские свинки, находящиеся в аналогичных условиях содержания. Взятие крови и прочие процедуры осуществлялись у интактных животных в те же сроки, что и у экспериментальных.

Содержание ВЭ в биологических образцах определяли по образованию бляшек под агаровым покрытием согласно методическим рекомендациям, изложенным в [17, 18] в модификации [19]. Для титрования дВЭ и адВЭ использовали культуру клеток Vero. Бляшки считали на 7-8-е сутки после инфицирования монослоя клеток указанными образцами.

Для подтверждения правильности идентификации митохондрий в мазках экспериментальных животных выделяли митохондрии из клеток Vero. Выделенные митохондрии изучали светооптически и электронно-микроскопически, а также оценивали их метаболическую активность.

Выделение митохондрий и процедуры с ними. Митохондрии выделяли из клеток Vero по методу [20] в собственной модификации. Клетки Vero получали из банка клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Снятые с культурального флакона клетки центрифугировали при $1000 \times g$ 5 минут, помещали осадок в ступку (предварительно охлажденную в морозилке). Приливали к осадку 5 мл охлажденного 0,25 М раствора сахарозы и тщательно гомогенизировали клеточный осадок (под контролем микроскопа до 90 % разрушенных клеток). Гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при 1500 об./мин для удаления обломков клеток и ядерной фракции. Супернатант отбирали и центрифугировали при 14500 об./мин в течение 10 минут. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали 0,25 М растворе сахарозы, повторно центрифугировали 10 минут при 14200 об./мин. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 0,25 М сахарозе центрифугировали при 14000 об./мин. Супернатант сливали. Отмывали полученные

митохондрии дважды в охлажденной эмбриональной сыворотке (Gibco) (10 минут при 14000 об./мин). Осадок ресуспендировали в 2,5 мл эмбриональной сыворотки. Суспензию митохондрий в 1 мл сыворотки помещали в термостат на 18 часов (37 °C), 1 мл сыворотки с митохондриями помещали в холодильник на 18 часов (4 °C). Контролем служили образцы эмбриональной сыворотки, которые стояли 18 часов в термостате и холодильнике. Из сыворотки с митохондриями делали мазки, фиксировали парами формалина (в течение 2-х суток), окрашивали азур-II-эозином по Романовскому-Гимзы и использовали для светооптического исследования. Осадок свежевыделенных митохондрий и осадок митохондрий после культивирования при 37 °C и 4 °C фиксировали в 4% растворе параформальдегида. Для получения ультратонких срезов осадки промывали раствором Хенкса, постфиксировали в 1 %-ном растворе четырехокси осмия, обезвоживали по стандартной методике, заливали в смесь эпон и аралдита. Готовили ультратонкие срезы на ультратоме Ultracut (фирмы Reichert-Jung, Австрия), затем срезы последовательно контрастировали спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца. Исследования ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония).

Определение неорганического фосфора (для оценки метаболической активности митохондрий, выделенных из клеток Vero, в процессе культивирования) проводили при помощи набора «Фосфор-ново» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Определение активности аминотрансфераз. Для определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотках крови морских свинок использовали стандартный биохимический набор "Lachema diagnostica Brno", чьи методические рекомендации основаны на методе Райтмана и Френкеля. Активность АСТ и АЛТ выражали в мкмоль/мл/ч.

Активность АСТ в среде культивирования митохондрий определяли на анализаторе «Labio-2000» (China) кинетическим методом. Активность АСТ выражали в ед. акт.

Результаты и обсуждение

Морские свинки, инфицированные дВЭ, внешне не имели признаков заболевания, однако у половины животных повышалась ректальная температура до 39,5-39,7 °C на 7-9-е сутки. Содержание вируса в крови и 10 %-ном печеночном гомогенате на 7-9-е сутки составило $10^{2,5}$ - 10^3 БОЕ/мл. У морских свинок, инфицированных адВЭ, ректальная температура повышалась до 40,0-40,5 °C на 7-9-е сутки. Животные становились малоподвижными, у них наблюдали эффект «мокрой шерсти» и потерю аппетита.

Начиная с 9-х суток, регистрировались летальные исходы. На 15-е сутки умерло последнее животное. Содержание вируса в крови и 10 %-ном печеночном гомогенате на 7-9-е сутки достигало 10^4 - 10^5 БОЕ/мл.

В крови морских свинок, инфицированных дВЭ и адВЭ, встречались единичные митохондрии (рис. 1) и скопления митохондрий (рис. 2). Скопления митохондрий встречались также в печени и костном мозге инфицированных животных (рис. 3 и 4).

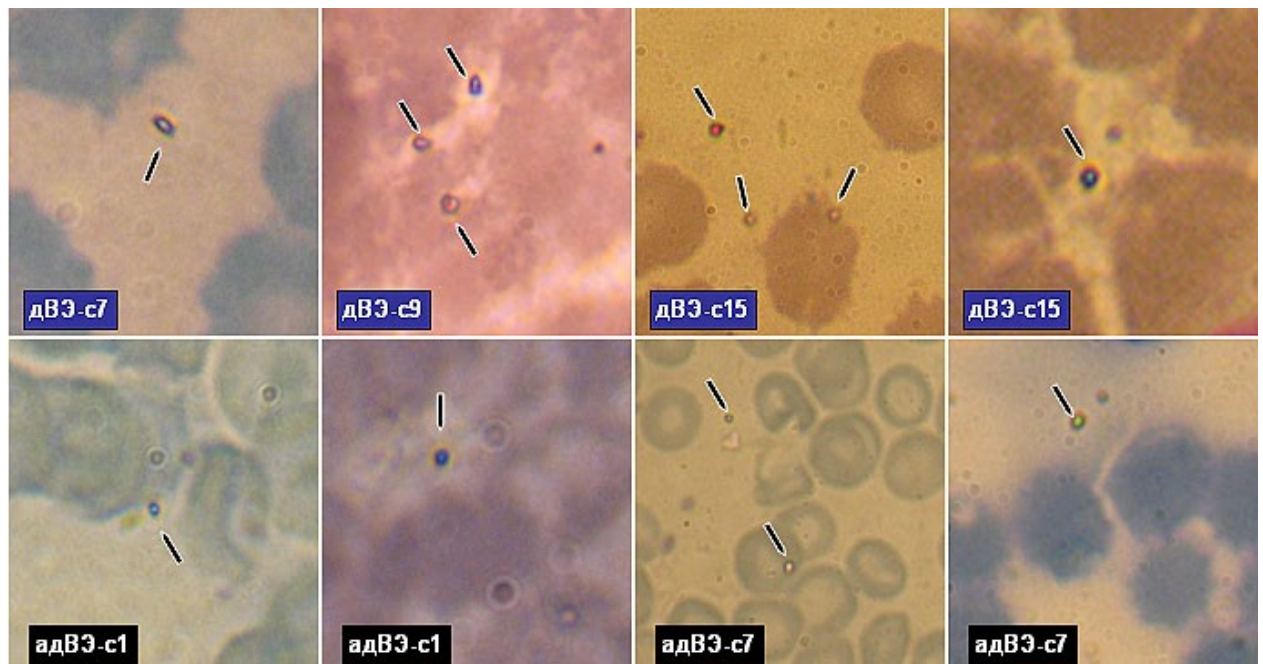


Рис. 1. Митохондрии в крови морских свинок в разные сроки после инфицирования дВЭ или адВЭ. Буква «с» после дефиса обозначает сутки. Стрелки выборочно указывают на митохондрии. Окраска азур-II-эозином. Увеличение $\times 1000$.

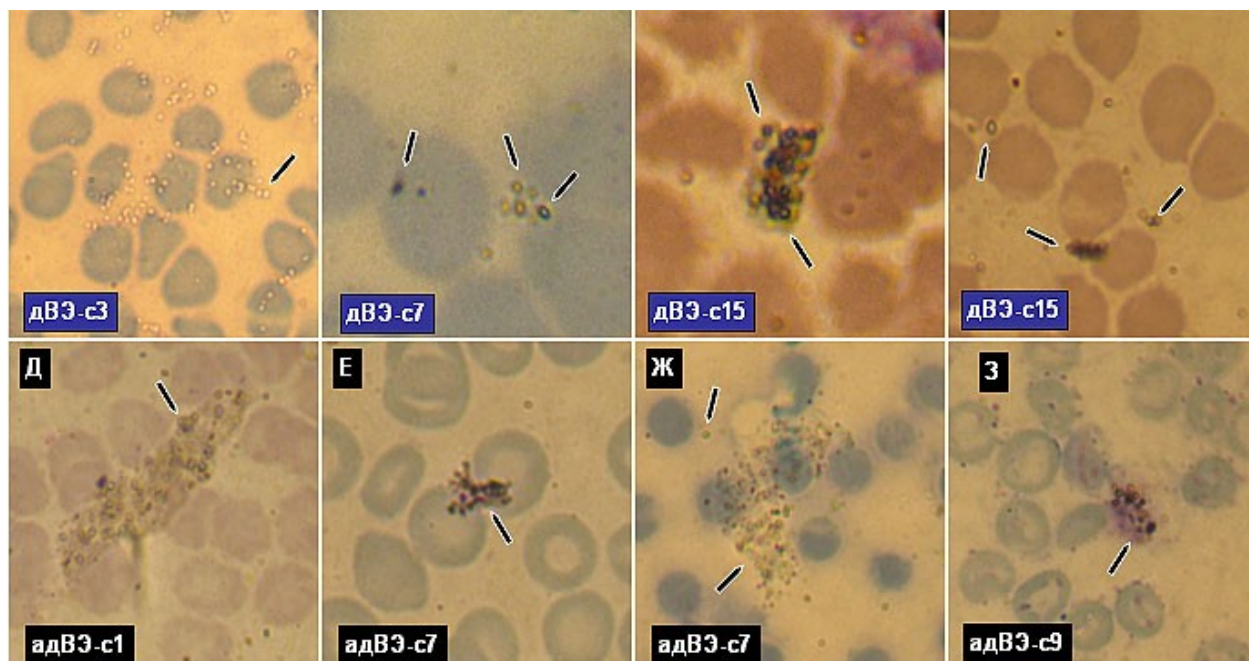


Рис. 2. Скопления митохондрий в крови морских свинок в разные сроки после инфицирования дВЭ или адВЭ. Буква «с» после дефиса обозначает сутки. Стрелки выборочно указывают на скопления митохондрий. Окраска азур-II-эозином. Увеличение $\times 1000$.

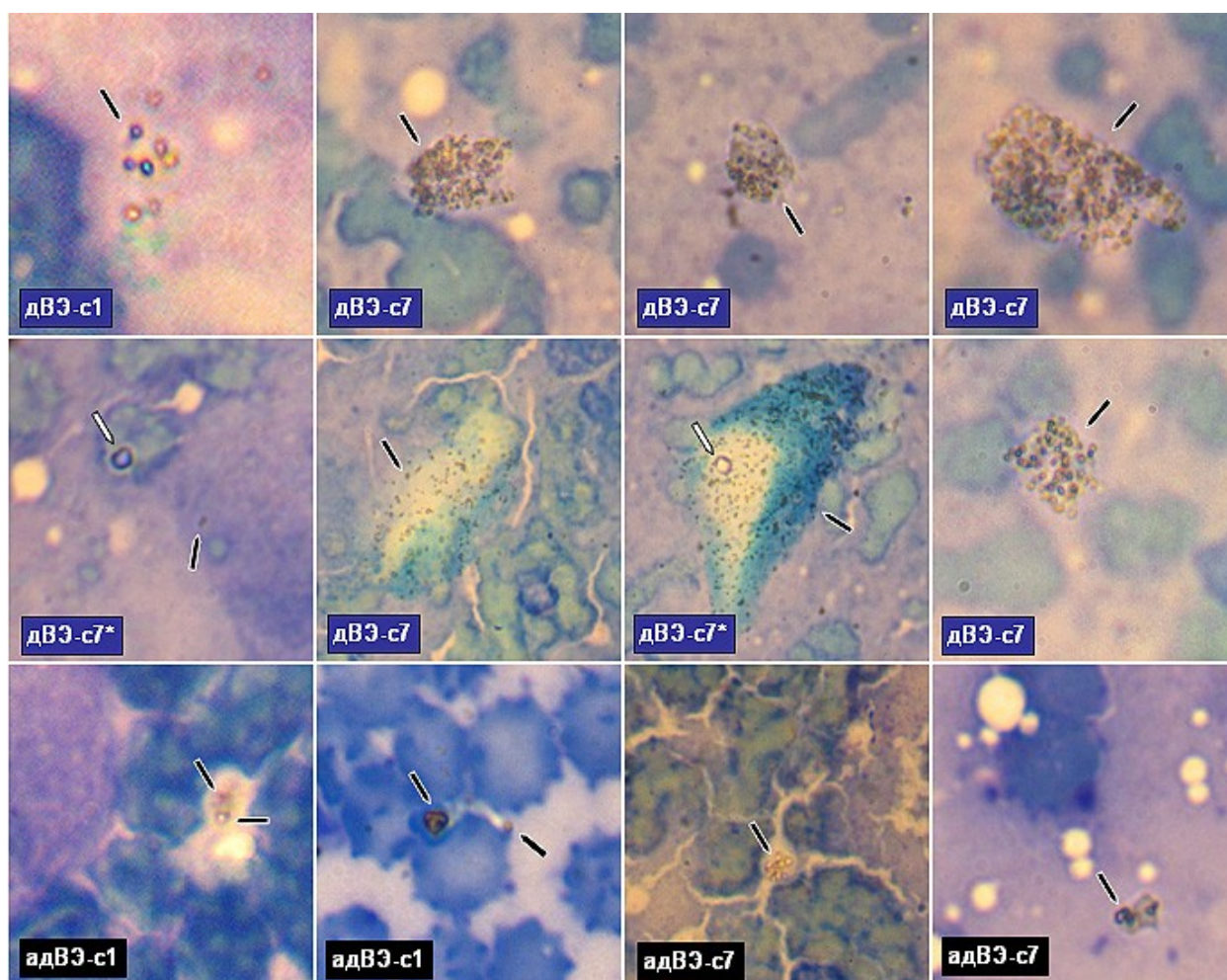


Рис. 3. Скопления митохондрий в печени морских свинок в разные сроки после инфицирования дВЭ или адВЭ. Буква «с» после дефиса обозначает сутки. Черные стрелки выборочно указывают на скопления митохондрий, белые стрелки - на мегамитохондрии. Звездочками отмечены фотографии, на которых присутствуют мегамитохондрии. Окраска азур-II-эозином. Увеличение $\times 1000$.

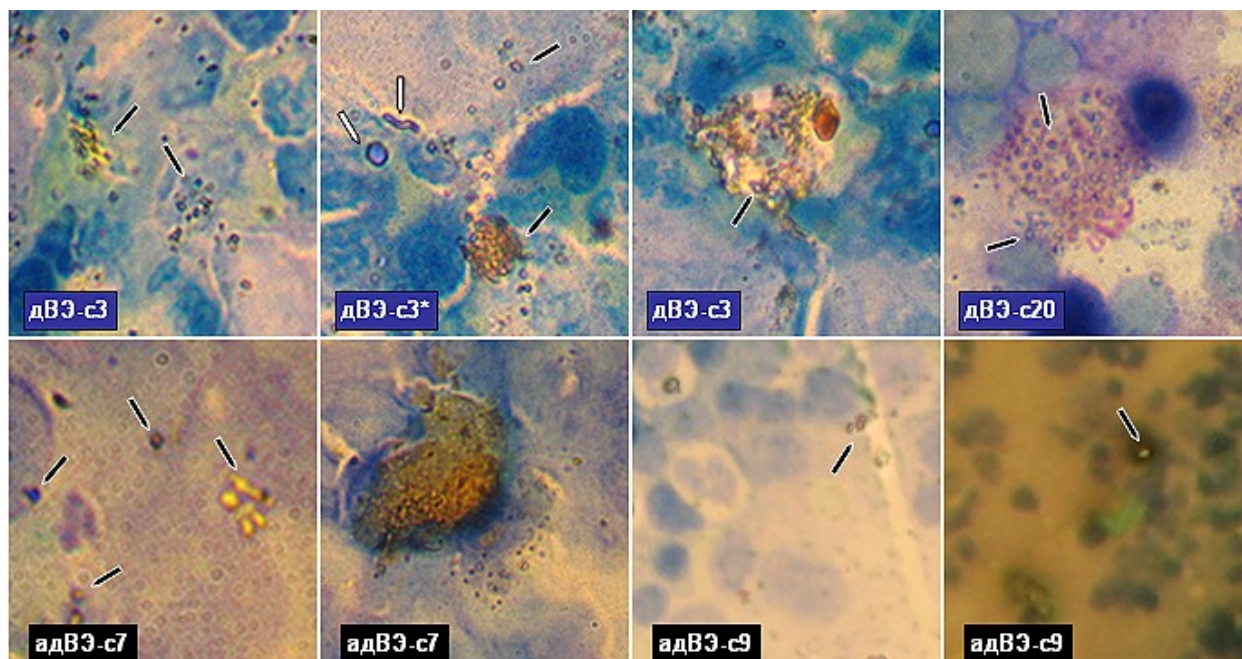


Рис. 4. Скопления митохондрий в костном мозге морских свинок в разные сроки после инфицирования дВЭ или адВЭ. Буква «с» после дефиса обозначает сутки. Черные стрелки выборочно указывают на скопления митохондрий, белые стрелки - на мегамитохондрии. Звездочками отмечены фотографии, на которых присутствуют мегамитохондрии. Окраска азур-II-эозином. Увеличение $\times 1000$.

Часть митохондрий образовывала мегаформы (рис. 3-4, фотографии, отмеченные звездочками). Мегаформы и скопления митохондрий образовывались и в культуре митохондрий, выделенных из клеток Vero (рис. 5), что демонстрировало выраженную реакцию митохондрий на изменение условий существования. Морфологически выделенные из клеток Vero митохондрии были идентичны митохондриям на мазках крови, костного мозга и мазках-отпечатках печени, полученным от инфицированных животных. Электронно-микроскопически также было подтверждено, что из культуры клеток Vero были выделены именно митохондрии.

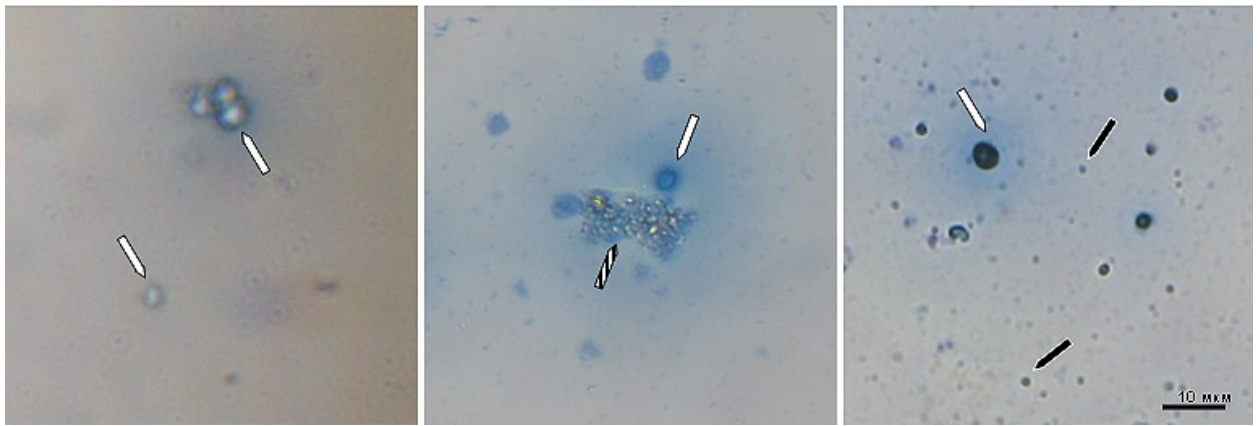


Рис. 5. Митохондрии, выделенные из культуры клеток Vero, отмытые эмбриональной сывороткой, не культивированные. Световая микроскопия. Черные стрелки выборочно указывают на митохондрии, белые стрелки – на мегамитохондрии, полосатые стрелки – на скопление митохондрий. Окраска азур-II-эозином. Увеличение $\times 1000$.

Учитывая, что главными клетками-мишенями ВЭ являются гепатоциты, и что при лихорадке Эбола формируются очаги некроза в печени, можно предположить, что встречаемые в крови митохондрии (и их скопления) выходили в основном из разрушающихся в ходе инфекции гепатоцитов.

Часть митохондрий, вышедших из гепатоцитов (а также из других инфицированных ВЭ клеток, например, макрофагов, эндотелиоцитов, фибробластов) и свободно циркулирующих по кровотоку, на мазках крови лежали вблизи аморфных структур различной окраски (рис. 6). Этими структурами, вероятно, являлись фрагменты распадающихся митохондрий.

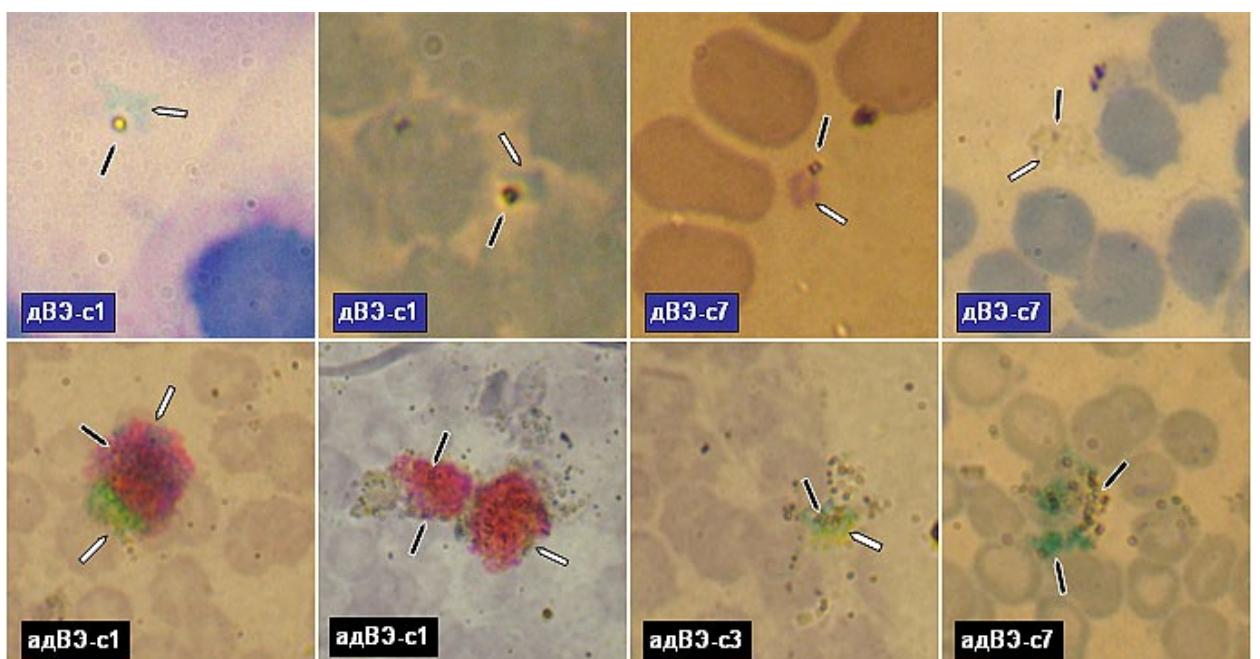


Рис. 6. Митохондрии, лежащие вблизи аморфных структур различной окраски в плазме крови морских свинок в разные сроки после инфицирования дВЭ или адВЭ. Буква «с» после дефиса обозначает сутки. Черные стрелки выборочно указывают на митохондрии, белые стрелки – на цветные структуры. Окраска азур-II-эозином. Увеличение $\times 1000$.

Часть митохондрий и их мегаформ светились при использовании фазового контраста (рис. 7). Можно предположить, что подобные митохондрии усиленно нарабатывали АТФ. Известно, что АТФ относится к группе фосфатов, а для фосфатов свойственна фотолуминесценция, активируемая источником света, и которая может продолжаться после прекращения действия источника света от нескольких секунд до нескольких минут [21]. Фактором, подтверждающим возможность наработки АТФ циркулирующими митохондриями, является снижение уровня фосфора в среде культивирования митохондрий, выделенных из клеток Vero (табл. 1), а также свечение некоторых выделенных из клеток Vero митохондрий (рис. 8). Т.е. молекулы неорганического фосфора тратились на переход АДФ в АТФ.

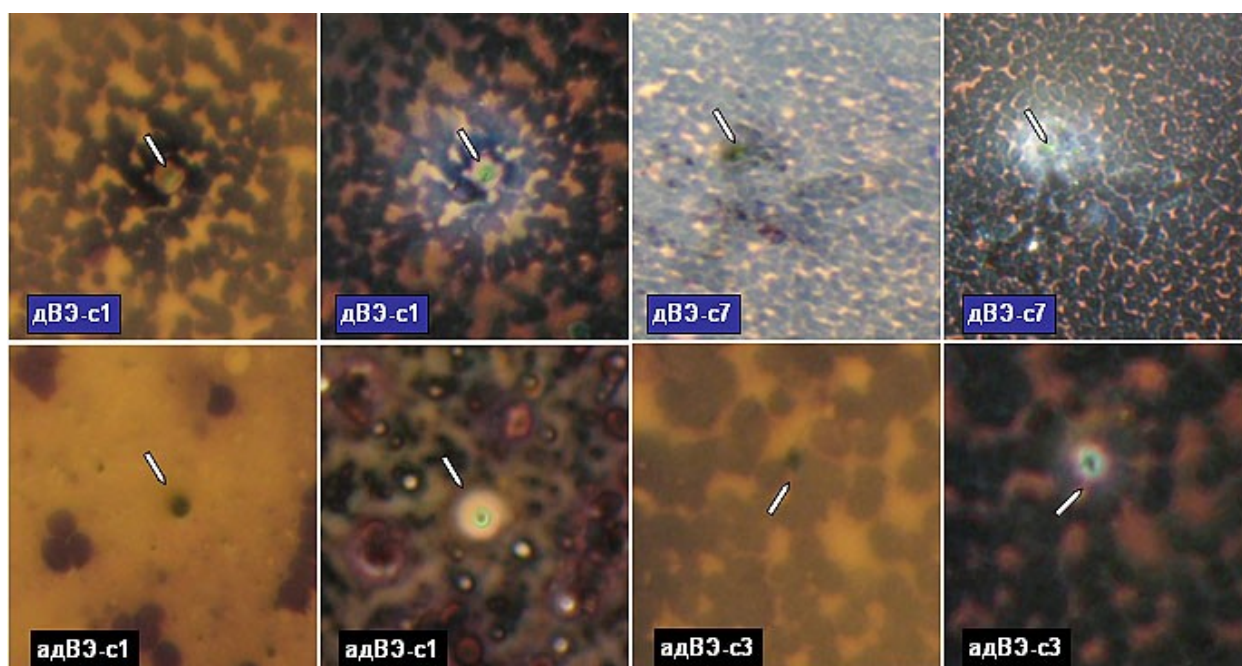


Рис. 7. Свечение митохондрий в окрашенных мазках крови морских свинок в разные сроки после инфицирования дВЭ или адВЭ при использовании фазового контраста. Представлены парные фотографии (при обычном свете и при использовании фазового контраста). Стрелки указывают на митохондрии. Окраска азур-II-эозином. Увеличение $\times 1000$.

Таблица 1.

Количество неорганического фосфора и активность АСТ и в эмбриональной сыворотке с выделенными митохондриями и в сыворотке без митохондрий

Образец	Фосфор (ммоль/л)	АСТ (ед. акт)
Эмбриональная сыворотка с выделенными митохондриями (18 часов в термостате)	$2,40 \pm 0,08$	$43,29 \pm 0,22$
Эмбриональная сыворотка с выделенными митохондриями (18 часов в холодильнике)	$2,72 \pm 0,08$	$15,60 \pm 0,10$
Эмбриональная сыворотка (18 часов в термостате)	$3,06 \pm 0,09$	$1,30 \pm 0,06$
Эмбриональная сыворотка (18 часов в холодильнике)	$3,15 \pm 0,1$	$2,22 \pm 0,10$

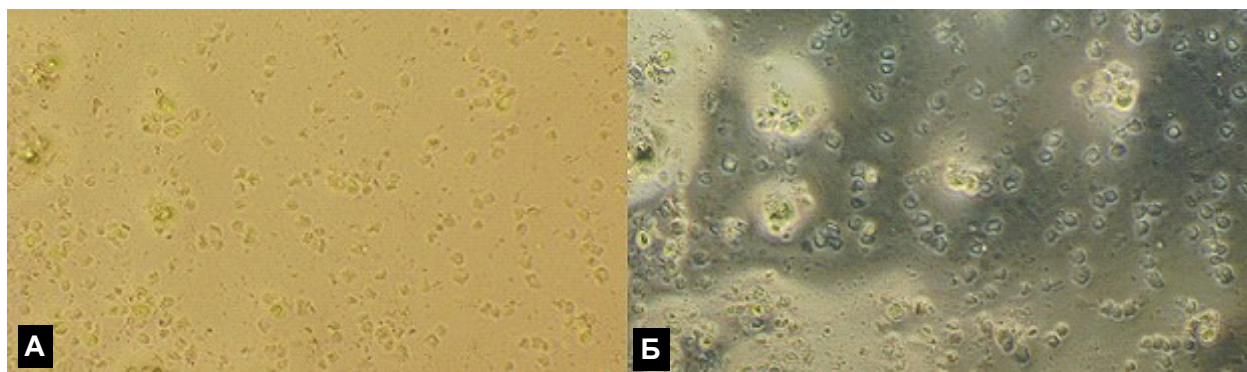


Рис. 8. Свечение митохондрий, выделенных из клеток Vero (после культивирования при 37 °С в течение 2-х часов). А – обычный свет, Б – фазовый контраст. Увеличение $\times 1000$.

Внеклеточные митохондрии могут оказывать существенное влияние на метаболизм фосфора в инфицированном организме. С одной стороны митохондрии должны его активно поглощать, используя для синтеза АТФ (сохраняя некоторое время свою жизнеспособность вне гепатоцитов и других инфицированных ВЭ клеток), а с другой стороны, фосфор должен образовываться в ходе распада АТФ и АДФ при разрушении митохондрий после их гибели. При этом известно, что патологоанатомическую картину острого фосфорного отравления составляют многочисленные кровоизлияния в коже,

подкожной клетчатке, в мышцах, серозных и слизистых оболочках [22, 23]. Не исключено, что геморрагии при лихорадке Эбола могут возникать в определенной степени за счет нарушения метаболизма фосфора.

Активность АСТ в сыворотках морских свинок, инфицированных адВЭ, в наших экспериментах превалировала над активностью АЛТ (рис. 9), что свойственно для изменения активности данных ферментов при лихорадке Эбола [24, 25, 26, 27]. Несмотря на массивное поражение печени, активность маркерного фермента поражения печени – АЛТ – оказывалась ниже, чем активность АСТ, значительное увеличение которой характерно для патологии сердца и скелетных мышц [28]. Это стойкое превышение активности АСТ над активностью АЛТ при лихорадке Эбола пока не находит своего объяснения.

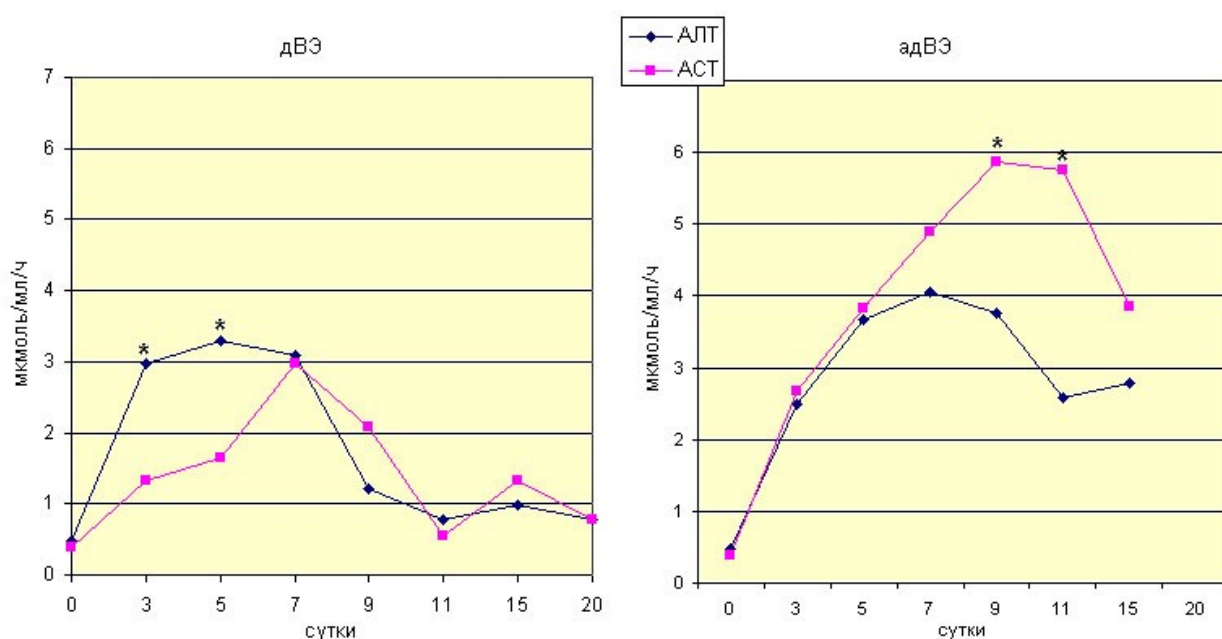


Рис. 9. Активность АЛТ и АСТ у морских свинок в разные сроки после инфицирования дВЭ или адВЭ. Данные представлены как средние значения по группе, ошибка средней не превышала 10 %. Звездочками указаны значения, имеющие достоверные различия с фоновыми показателями при $p < 0,05$.

АСТ – фермент из группы аминотрансфераз, катализирующих взаимопревращения аминокислот и кетокислот путем переноса аминогруппы [28]. Известно, что АСТ в клетках представлена двумя изоферментами – митохондриальным и цитоплазматическим. Около 1/3 общей внутриклеточной активности АСТ локализуется в цитоплазме клеток, 2/3

– в митохондриях. В работе Дайниченко Е.В. (2009) показано, что АСТ локализуется в митохондриальном матриксе [29].

Мы измерили активность АСТ в среде культивирования выделенных из клеток Vero митохондрий (табл. 1) Культивирование митохондрий при 37 °С привело к росту активности АСТ по сравнению с контрольной пробой (среда без митохондрий) более чем в 30 раз, а по сравнению с митохондриями, культивируемыми при 4 °С, – в 7 раз. Эти данные свидетельствуют о гибели митохондрий с распадом их структуры и выходом в среду культивирования АСТ, что подтверждается также структурными изменениями культивируемых митохондрий при электронно-микроскопическом исследовании (рис. 10). Структура митохондрий на электронно-микроскопических снимках потеряла четкость, что можно расценить, как начало гибели данных органелл.

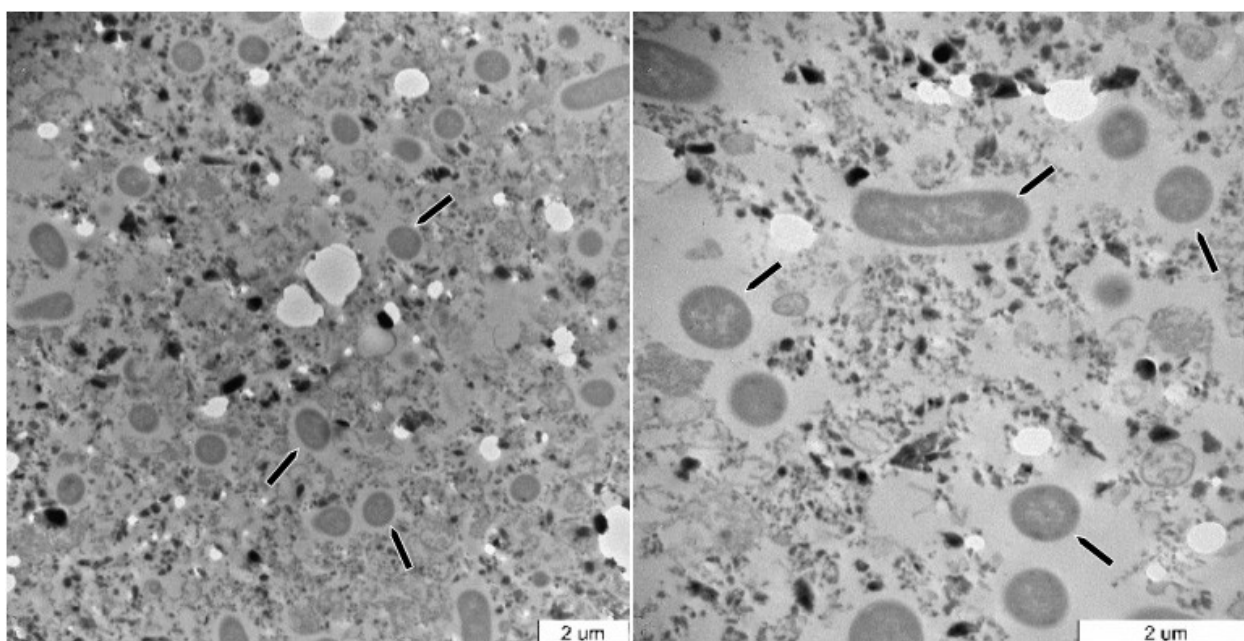


Рис. 10. Митохондрии, выделенные из культуры клеток Vero и культивированные 18 часов в эмбриональной сыворотке при 37 °С. Электронная микроскопия. Стрелки выборочно указывают на митохондрии.

Можно предположить, что подобный процесс имеет место и при лихорадке Эбола, когда вышедшие из гепатоцитов митохондрии после циркуляции по кровотоку в течение некоторого времени погибают и АСТ поступает в плазму крови. Таким образом, превалирование активности АСТ над активностью АЛТ при лихорадке Эбола может быть объяснено поступлением АСТ в плазму крови из погибающих внеклеточных митохондрий, появляющихся в крови в результате распада гепатоцитов и прочих клеток

инфицированного ВЭ организма. Поступление АСТ в плазму крови неизбежно должно сказываться на процессах синтеза и распада циркулирующих в кровотоке белков, тем более, что каталитическая активность митохондриальной АСТ имеет более высокие величины K_m для α -кетоглутарата и более низкие для L-аспартата [28].

В работе Zhang Q. et al. (2010) было сообщено, что митохондрии могут стать причиной иммунной атаки организма на собственные клетки - митохондрии с эволюционной точки зрения являются эндосимбионтами эукариотических клеток и могут нести в себе бактериальные молекулярные мотивы, и именно в силу этих мотивов восприниматься иммунной системой организма, как ксенобиотики [30, 31]. Ранее было предположено, что аутоиммунные процессы могут являться существенным моментом в патогенезе лихорадки Эбола [32, 33]. Учитывая появление большого количества митохондрий, а также продуктов их распада, в кровотоке и тканях инфицированных ВЭ морских свинок, не исключено, что организм морских свинок может воспринимать митохондрии, как чужеродные агенты (в силу наличия бактериальных молекулярных мотивов в их структурах) и начинать против них иммунологическую атаку, что может усугублять тяжесть заболевания.

С нашей точки зрения митохондрии привносят в патогенез лихорадки Эбола дополнительную перегрузку инфицированного ВЭ организма митохондриальными белками, добавляя их количество к вирусным белкам и белкам клеточного детрита (разрушающиеся гепатоциты и прочие виды инфицированных клеток) (рис. 11). Подтверждением такой перегрузки может служить печень морских свинок, инфицированных адВЭ (в разные сроки после введения вирусного материала), и костный мозг морских свинок, инфицированных адВЭ, на 15-е сутки после введения вирусного материала (терминальный день), которые переполнялись клеточным детритом и белками, соответственно (рис. 12 и 13). В печени клеточный детрит был следствием гибели гепатоцитов, а в костном мозге - следствием некроза бластных элементов, ведущим к нарушению функции кроветворения. И в том и другом случае процессы гибели клеток имели усиливающийся характер и в детрите присутствовали митохондрии.

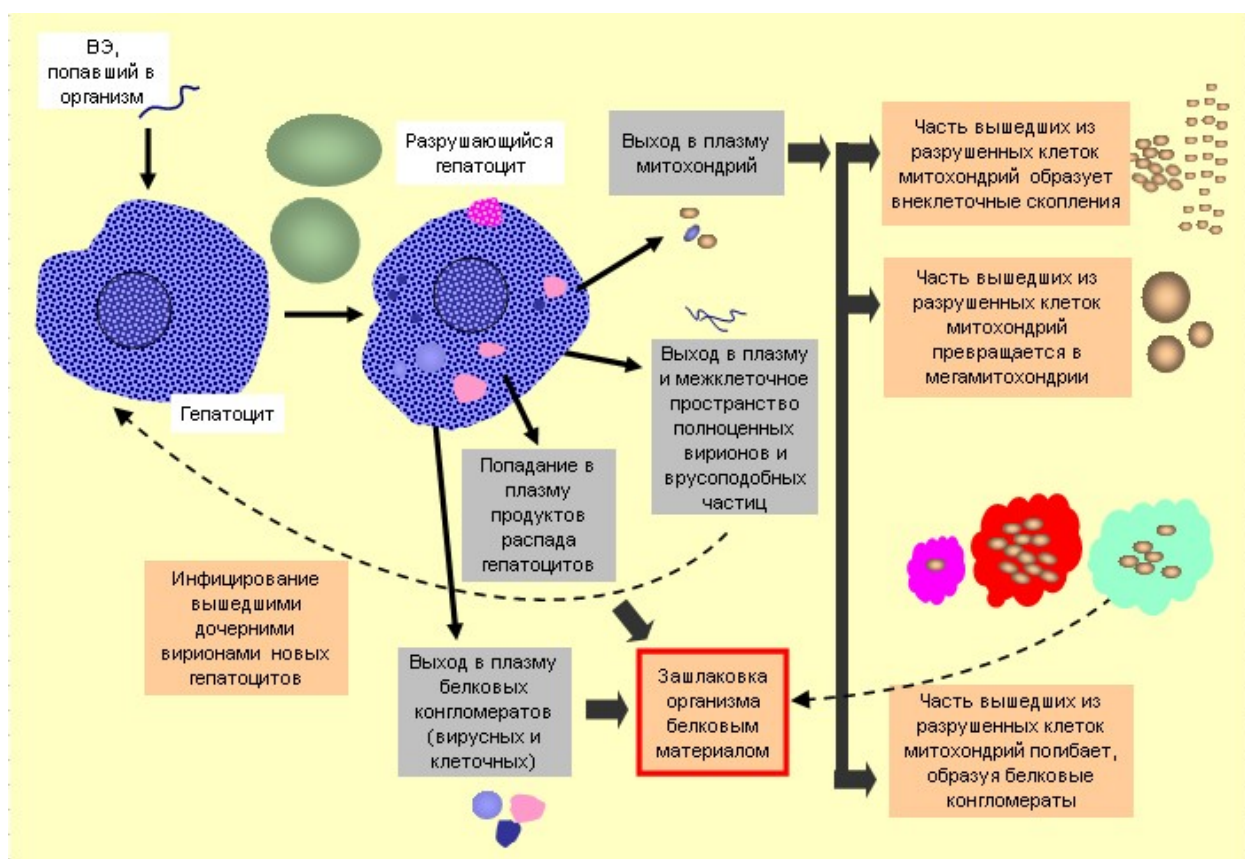


Рис. 11. Схема перегрузки инфицированного ВЭ организма различными белками.

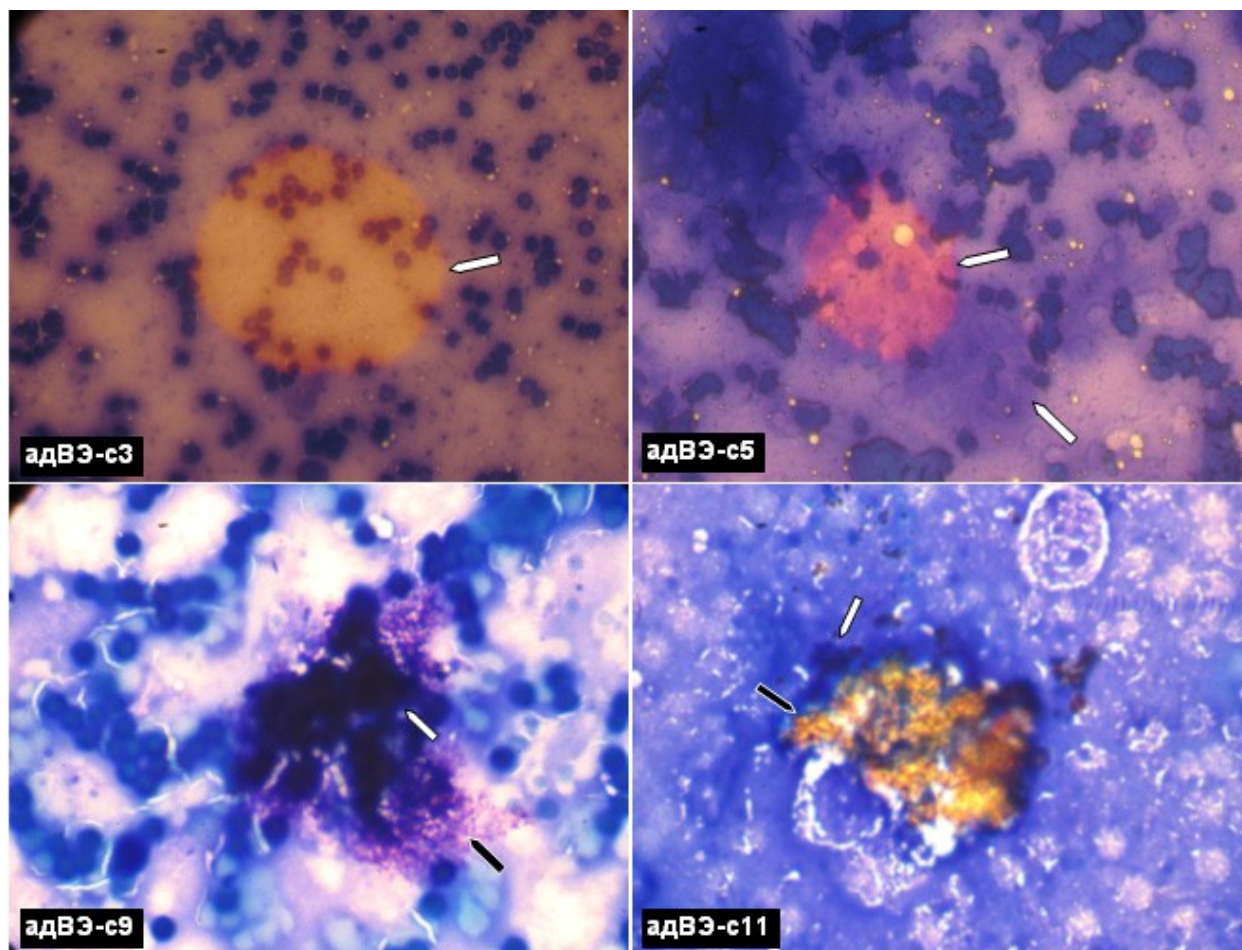


Рис. 12. Переполнение печени морских свинок белками различной окраски в разные сроки после инфицирования адВЭ. Белые стрелки выборочно указывают на белковые конгломераты, черные стрелки – на детрит, содержащий митохондрии. Окраска азур-П-эозином. Увеличение $\times 1000$.

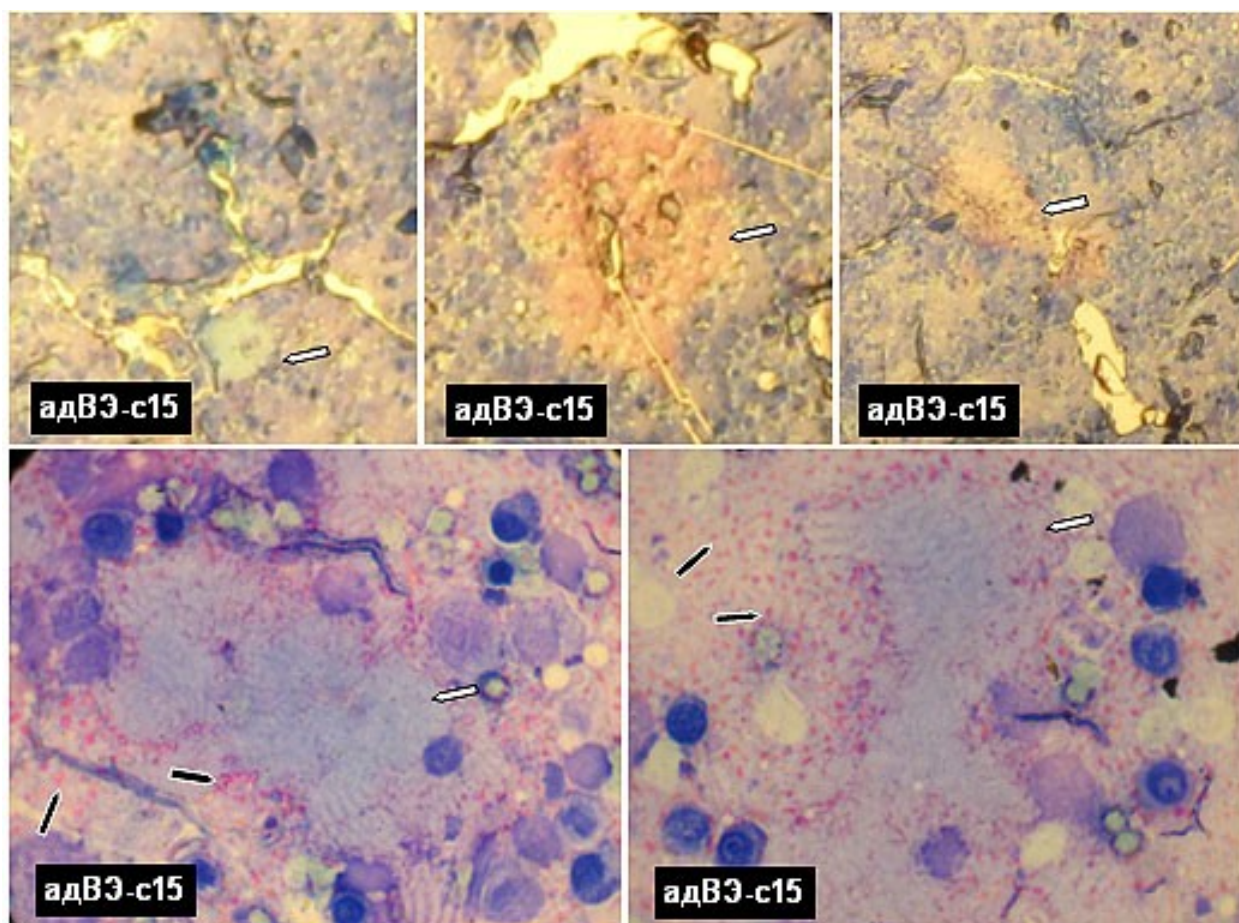


Рис. 13. Переполнение костного мозга морских свинок, инфицированных адВЭ, белками различной окраски в терминальную стадию инфекции. Белые стрелки выборочно указывают на белковые конгломераты, черные – на митохондрии. Окраска азур-П-эозином. Увеличение $\times 1000$.

При этом существенным является количество митохондрий, выходящих из разрушающихся гепатоцитов и прочих инфицированных ВЭ клеток. Чем больше клеток разрушается, тем более сильной оказывается белковая перегрузка организма, в том числе и митохондриальными белками, которые могут дополнительно восприниматься иммунной системой организма, как бактериальные. В случае инфицирования морских свинок дВЭ, поражение печени не носит такого масштабного характера, как при инфицировании животных адВЭ, и организм имеет больше шансов справиться с наличием вирусных и митохондриальных белков, пока не заработает в полную силу антителообразование, направленное в первую очередь против ВЭ. В случае адВЭ уже на ранних сроках после инфицирования начинается гибель гепатоцитов и выход в кровоток всё больших и больших количеств митохондрий с одной стороны и прогрессивно нарастающего количества вирионов с другой стороны. И тот и другой процесс, в конечном счете,

приводит к образованию белковых конгломератов, чье количество неостановимо нарастает в ходе инфекции.

При взятии крови у морских свинок в предтерминальную и терминальную стадии инфекции (3 мл в сухую пробирку) после 20-минутного центрифугирования при 2000 об./мин (а иногда и после повторного центрифугирования при 2500 об./мин) отобрать сыворотку было практически невозможно. Осадок эритроцитов был покрыт 1-1,5 см слоем светлой желированной массы. Очевидно, фибриллярные белки уходили в осадок и желировались при температуре ниже 37 °С.

Следует сказать, что у интактных животных в мазках крови и костного мозга, в мазках-отпечатках различных органов встречались единичные редкие митохондрии, что было, скорее всего, результатом неизбежного травмирования клеток в процессе приготовления мазков. Ни мегаформ митохондрий, ни скоплений митохондрий в мазках крови и мазках отпечатков различных органов у интактных животных мы не наблюдали.

Исходя из представленных данных, можно заключить, что митохондрии, выходящие из разрушающихся в ходе Эбола-инфекции гепатоцитов (и прочих видов инфицированных клеток), являются источником дополнительного поступления в кровоток белкового материала (образующегося в ходе их распада), что при инфицировании адВЭ приводит к значительному накоплению белка в печени и костном мозге животных. Митохондриальные белки могут также быть фактором иммунной агрессии организма. Гибель митохондрий приводит к превалированию активности АСТ над активностью АЛТ – АСТ выходит из разрушающихся митохондрий в плазму крови, оказывая влияние на синтез и распад циркулирующих в кровотоке белков. Погибающие митохондрии могут быть и дополнительной причиной образования геморрагий за счет образования неорганического фосфора в ходе распада АТФ и АДФ. В свете сказанного изучение влияния антибиотиков (митохондрии чувствительны к антибиотикам [1]) на ход инфекционного процесса у инфицированных ВЭ экспериментальных животных становится актуальным. Раннее введение специально подобранных антибиотиков предположительно может существенно уменьшить летальность лихорадки Эбола.

Литература

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Издательство «Мир», 1986. – Т.3, 296 с.
2. Takebayashi S., Kaneda K. Mitochondrial derangement: possible initiator of microalbuminuria in NIDDM // J. Diabet Complications. – 1991. – Vol. 5. – P. 104-106.

3. Szabolcs M.J., Seigle R., Shanske S. et al. Mitochondrial DNA deletion cause of chronic tubulointerstitial nephropaty // J. Kidney Int. – 1994 – Vol. 45. – P. 1388.
4. Сухоруков В.С., Клембовский А.И., Невструева В.В. и др. Митохондриальная природа кардиомиопатий у детей (анализ биоптатов скелетных мышц) // Архив патологии. - 1997. - Т.5, №59. - С. 12–21.
5. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al. Mutation in the a-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease // Science. - 1997. – Vol. 276. - P. 2045-2047.
6. Rustin P., Munnich A., Rotig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme // Eur. J. Human Genetic. - 2002. - Vol.58. - P. 289–291.
7. Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M. et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase // Nature.- 2004. Vol. 429. - P. 417-423.
8. Alaynick W.A. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism // Mitochondrion. - 2008. Vol.8. - P. 329–337.
9. Endo T, Yamano K. Multiple pathways for mitochondrial protein traffic // Biol Chem. – 2009. – Vol. 390. – P. 723-730.
10. Baker M.J., Frazier A.E., Gulbis J.M., Ryan M.T. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function // Trends Cell Biol. – 2007. – Vol. 17. – P.456-464.
11. Шлопов В.Г. Ультраструктурная патология клетки [электронный ресурс] // URL <http://nature.web.ru/db/msg.html?mid=1164653&uri=4.html> (дата обращения 26.11.2009).
12. WHO. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. International Study Team Report // Bull WHO. - 1978. - Vol.56.- P.271-293.
13. WHO. Ebola haemorrhagic fever // WER. - 1995. - Vol.70. - P.149-152.
14. Chepurnov A.A., Zubavichene N.M., Dadaeva A.A. Elaboration of laboratory strains of Ebola virus and study of pathophysiological reactions of animals inoculated with these strains // Acta Trop. – 2003. – Vol. 87. – P. 321-329.
15. Chepurnov A.A., Zubavichene N.M., Dadaeva A.A. Influence of selective passages on the change in Ebola virus properties // Infect.Dis.Rev. - 2001. - Suppl. 3. - P.30-36.
16. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. National Academy Press, Washington, D.C. – 1996. – 137 с.

17. Lupton H.W. Inactivation of Ebola virus by the use of Co⁶⁰-radiation // J. Inf. Dis. - 1981. - Vol.143, N2. - P. 291-299.
18. Moe J.B., Lambert R.D., Lupton H. W. The plaque-forming test for Ebola virus // J.Clin. Microbiol. - 1981. - Vol.13, N4. - P.791-793.
19. Устинова Е.Н., Шестопапов А.М., Бакулина Л.Ф., Чепурнов А.А. Титрование вирусов Эбола и Марбург по бляшкообразованию под полужидким агаровым покрытием // Вопр. вирусол. – 2003. – Т. 48, N 1. – С. 43-44.
20. Attardi G., Ching E. Biogenesis of mitochondrial protein in HeLa cells // Methods Enzymol. -1979. – Vol. 56. – P. 66-79.
21. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. М., 1984.
22. Грацианская Л.Н., Фролова М.А. Юркевич А.Я. Социально-трудовая и медицинская реабилитация больных профессиональными заболеваниями. Л., 1978.
23. Справочник по профессиональной патологии, под ред. Л.Н. Грацианской и В.Е. Ковшило, Л., 1981.
24. Fisher-Hoch S.P., Platt G.S., Neild G.H., Southee T., Baskerville A., Raymond R.T., Lloyd G., Simpson D.I.H. Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola) // J. Infec. Dis. - 1985.- Vol.152, N5. -P.887-894.
25. Connolly B., Steele K., Davis K. et al. Pathogenesis of experimental EBOla virus infection in guinea pigs // J. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 179. - P. 203-217.
26. Formenty P., Hatz C., Le Guenno B. et al. Human Infection due to Ebola virus subtype Cote d'Ivoire: clinical and biological presentation // J. Infec.Dis. – 1999. – Vol. 179. – P. 48-53.
27. Акинфеева Л.А., Аксенова О.И., Василевич И.В. и др. Случай вирусной геморрагической лихорадки Эбола // Инфекционные болезни. – 2005. - Т. 3, № 1. - С. 85-88.
28. Лабораторные методы исследования в клинике. Под редакцией Меншикова В. В. – М: Медицина, 1987. – 365 с.
29. Дайниченко Е.В., Болдырев А.Н., Барылюк К.В. и др. Протеомный анализ митохондрий сердца Bos taurus. II. Идентификация растворимых белков // Биоорганическая химия. - 2009. - № 4. - С. 457-470.
30. Zhang Q., Raoof M., Chen Y., et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury // Nature. – 2010. – Vol. 464. – P. 104-107.

31. Collins L.V., Hajizadeh S., Holme E. et al. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses // J. Leukoc. Biol. – 2004. - Vol. 75. – P. 995–1000.
32. Chepurnov A.A., Chernukhin I.V. // Abs. Xth Int. Cong. Vir., Jerusalem, Israel, 11-16 aug. - P.259.
33. Дадаева А.А., Сизикова Л.П., Жуков В.А., Чепурнов А.А. Динамика иммунологических показателей у морских свинок при введении различных препаратов вируса Эбола // Вопр. Вирусол - 1998. - N4. - С.163-169.