ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ
ԱԿԱԴԵՄԻԱ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՍԱՐՈՅԱՆ ԴԱՎԻԹ ԱՇՈՏԻ

ՄԻԵԼՈՊՈԷԶԻ ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԸ ԽՈԶԵՐԻ ՍՈՒՐ ԱՖՐԻԿՅԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ՁԱՐԳԱՑՄԱՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՅՈՒՄ

Գ.00.03 - «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսություն

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

САРОЯН ДАВИД АШОТОВИЧ

НАРУШЕНИЕ МИЕЛОПОЭЗА ПРИ ОСТРОЙ ФОРМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – “Молекулярная и клеточная биология”

ЕРЕВАН – 2016

© National Library of Armenia OCR by Portmind

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝	կենս. գիտ. դոկտոր Զ.Ա. Կարալյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	կենս. գիտ. դոկտոր Գ.Գ. Հովհաննիսյան
	անաս. գիտ. թեկնածու Մ.Ա. Սարգսյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոնի Կենդանաբանության ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. հունիսի 10-ին, ժամը 14:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդում (ՀՀ, 0014, Երևան, Հասրաթյան 7):
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և http://molbiol.sci.am կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2016թ. մայիսի 10-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
կենս. գիտ. թեկնածու Գ.Մ. Մկրտչյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА.

Научный руководитель:	доктор биол. наук Каралян З.А.
Официальные оппоненты:	доктор биол. наук Ованесян Г.Г.
	кандидат ветер. наук Саркисян М.А.
Ведущая организация:	Научный Центр Зоологии и Гидроэкологии-Институт зоологии НАН РА

Защита диссертации состоится 10 июня 2016 г. в 14:00 часов на заседании специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте http://molbiol.sci.am.

Автореферат разослан 10 мая 2016 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук Мкртчян Г.М.

© National Library of Armenia

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Современный этап естественной истории африканской чумы свиней (АЧС) охватывает постоянное неблагополучие традиционных природно-очаговых нозоареалов Африки, а также эпизоотии и отдельные вспышки болезни в различных странах Европы. С начала 21 века африканская чума свиней появилась в Грузии, а затем в Армении. Известно, что возбудителем заболевания является крупный оболочечный вирус, содержащий двуспиральную ДНК. Независимо от способа распространения вирус 100% поражает домашних и диких свиней всех возрастов и при острой форме вызывает 100% летальность. Он размножается в клетках иммунной системы и, прежде всего, в клетках моноцитарно-макрофагального ряда, которые являются первой и основной мишенью репликации вируса АЧС.

Физиология клеток системы мононуклеарных фагоцитов и их значение в иммунном ответе достаточно исследованы и описаны. Решены наиболее общие проблемы, касающиеся значения мононуклеарных фагоцитов в инфекционном процессе для патогенов с внутриклеточной локализацией. Однако остаются малоизученными многочисленные аспекты биологии и патологии инфекционных процессов в тех случаях, когда гемопоэтические клетки являются критической мишенью или имеют преобладающее значение в размножении возбудителей различной природы, как и при АЧС, когда только гемопоэтические клетки спонтанно чувствительны к вирусу АЧС. I*n vitro* вирус размножается и обычно культивируется в моноцитах/макрофагах из различных тканевых источников и обнаруживается, главным образом, в клетках макрофагального ряда, Однако он способен реплицироваться и в других клетках лейкоцитарной линии, наибольшее значение из которых представляют нейтрофилы. Последние являются самыми распространенными и важными клетками неспецифической защиты внутренней среды организма животных и человека от инфекций (бактерий и вирусов). Отсюда и важность исследования количественного и качественного состава клеточных элементов системы кроветворения, и, в частности, популяции миелоидных клеток, так как изменения, выявляемые в них, являются доступными и важными индикаторами нарушений в системе кроветворения и функционирования форменных элементов крови, позволяя обнаружить их изменения при определенных патологических состояниях.

Изучение первичной культуры костного мозга (ПККМ) свиней представляет собой удобную модель для исследования некоторых сторон патогенеза АЧС, и, в частности, дифференцировку и транскрипционную активность различных гемо- и иммунопоэтических клеток. В данной работе исследовались популяционные показатели миелоидных клеток ПККМ, их выживаемость и транскрипционную активность, т.к. они могут явиться источником дополнительной репликации вируса. Проведено уточнение патологии иммунной системы при АЧС и выявление роли интерлейкинов ИЛ-17 и ИЛ-23, а также гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ) в динамике АЧС.

Отсюда и целью работы явилось:

Исследование изменений физиологии миелоидных клеток периферической крови и костного мозга свиней в процессе острой формы АЧС, изучение особенностей выживания миелоидных клеток свиней в процессе культивирования с вирусом АЧС. Выяснение влияния основных антивирусных цитокинов на миелопоэз при АЧС.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

© National Library of Armenia

1. Исследование морфологически распознаваемых миелоидных клеток периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) здоровых и больных острой формой АЧС.
2. Исследование миелоидных клеток ПККМ свиней, зараженных АЧ, в течение четырех суток культивирования.
3. Исследование ряда интерлейкинов в сыворотке ПК здоровых и больных острой формой АЧ свиней.

Для этого:

а) На популяционном уровне

Был проведен морфологический анализ миелоидных клеток ПК, КМ и ПККМ свиней в контроле и изменение их соотношения на всех стадиях острой формы АЧС.

б) На клеточном уровне во всех исследуемых клетках:

Изучалась динамика изменений площади цитоплазмы, ядра и ядрышек миелоидных клеток ПК, КМ и ПККМ свиней в контроле и на всех стадиях АЧС.

в) На субклеточном уровне во всех исследуемых миелоидных клетках:

1. Выявлялась динамика изменений в содержании РНК цитоплазмы, ядрышек и ядер миелоидных клеток ПК, КМ и ПККМ в контроле и на всех стадиях АЧС.

2. Определялось среднее содержание ДНК в ядрах миелоидных клеток ПК, КМ и ПККМ и построены гистограммы распределения ДНК по классам плоидности в контроле и при АЧС.

3. Определялась динамика выброса ряда основных антивирусных цитокинов в ПК при АЧС.

Научная новизна работы.

1. Проведено морфологическое исследование динамики изменений в соотношении морфологически распознаваемых миелоидных клеток ПК и КМ в контроле и на всем протяжении острой формы АЧС.
2. Проведено морфологическое исследование динамики изменений в соотношении миелоидных клеток ПККМ, зараженной вирусом АЧС в течение четырех суток культивирования.
3. Проведено цитоморфометрическое исследование популяции миелоидных клеток ПК, КМ и ПККМ, определена динамика изменений размеров их ядер, ядрышек и цитоплазмы в контроле и во всех опытах
4. Исследованы изменения в содержании РНК и ДНК в миелоидных клетках ПК, КМ и ПККМ в динамике острой формы АЧС.
5. Исследована динамика выброса ряда основных антивирусных цитокинов в ПК.

Практическая значимость работы

Нами показано, что популяционные изменения в миелоидных клетках ПК и КМ при острой форме АЧС являются не непосредственно вирус-индуцированными, а ответной реакцией организма на виремию. Механизм, запускающий популяционные изменения миелоидных клеток ПК и КМ, связан с достоверным увеличением содержания ИЛ-17 и ИЛ-23. В пользу подобного заключения говорит и то, что увеличению концентрации этих цитокинов в сыворотке крови предшествует нейтропении. Усиление же синтеза G-CSF происходит после возникновения нейтропении и направлено на усиление пролиферации этих клеток, для компенсации их убыли. Эти исследования помогают уточнить патологию иммунной системы при АЧС.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 7 научных публикациях.

© National Library of Armenia

Структура и объём диссертации. Работа изложена на 103 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц и 17 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения и выводов. Список цитируемой литературы содержит 192 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментальной модели использовали 18 свиней возрастом от 3 до 4 месяцев и весом 35-40 кг. 14 свиней заражали подкожным введением вируса АЧС, а 4 свиньи использовали в качестве контроля. На терминальной стадии (7-е сутки болезни) животных умерщвляли. Эвтаназия свиней проводилась согласно Guide for the Care and Use of laboratory Animals, AVMA протоколу. В работе использовали вирус АЧС генотип (II), выделенный из селезенки и печени больных свиней. Титрация и определение дозы вируса осуществлялись рутинным методом гемадсорбирующих единиц, согласно Энхуанес. Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях, определялась в лаборатории до начала эксперимента и составляла 104 гемадсорбирующих единиц – ГАЕ 50/мл.

Работу проводили на мазках клеток ПК, которая бралась из глазного венозного синуса ежесуточно в течение 7 дней болезни в одно и то же время у свиней, зараженных вирусом АЧ. Контролем служили те же свиньи, у которых до введения вируса брали ПК. Отпечатки готовили из КМ, взятого из бедренной кости здоровых и зараженных вирусом АЧ свиней. Из клеток костного мозга 4-х здоровых свиней готовили ПККМ и в часть флаконов добавляли вирус АЧ в определённой концентрации, после чего через 24, 48, 72 и 96 часов из суспензии клеток контрольной и опытной культур для морфологических и цитохимических исследований готовили мазки. Все мазки фиксировали в 96% этиловом спирте в течение 30 мин. Морфологический анализ нейтрофилов крови проводили на мазках, окрашенных гематоксилин-эозином по Романовскому-Гимза. Определяли основной состав клеток ПК, КМ и ПККМ их процентное соотношение, а также распределение миелоидных клеток по степени зрелости на всех сроках заболевания. В каждом случае исследовалось не менее 1500 клеток. Подсчет миелограммы КМ проводили на основе анализа всех клеток КМ в 75 полях зрения, а затем оценивали клеточность костного мозга. Определялся также индекс сдвига нейтрофилов (ИС) по формуле: ИС= (МЭ+ ПМ+ММ+П)/С, где МЭ – миелобласты, М — промиелоциты, ММ — метамиелоциты, П — палочкоядерные и С — сегментоядерные нейтрофилы.

Количество ДНК в мазках ПК, отпечатках КМ и мазках ПККМ определялось в ядрах всех видов миелоидных клеток, окрашенных реактивом Шиффа по Фельгену при длине волны 575 нм с визуализацией изображения (увел. 100х1.30), на цитоспектрофотометре, созданном на базе микроскопа-фотометра SMP 05 (OPTON, ФРГ), телевизионным методом. В каждом случае производили измерения в 100 ядрах. Вычисляли среднее содержание ДНК в ядре и ядрышках (в условно сравнимых единицах), определяли площадь ядер и ядрышек и высчитывали среднее число ядрышек на ядро. На основании полученного материала по содержанию ДНК в ядрах строились гистограммы их распределения по классам плоидности. Для их построения определяли стандартное диплоидное количество ДНК в ядрах лимфоцитов ПК здоровых свиней, которое строго соответствует содержанию ДНК в диплоидной популяции в фазах Go /G1 клеточного цикла.

Для количественного анализа содержания РНК и размеров миелоидных клеток мазки ПК, ПККМ и отпечатки КМ одновременно окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами в течение 48 часов в свежеприготовленном растворе, после чего для количественного анализа содержания РНК и размеров ядрышек, ядер, цитоплазмы и

© National Library of Armenia

клетки в целом использовалась стандартная программа открытого доступа ImageJ. Все размеры клеток даны в мкм2, а содержание РНК и ДНК в условно сравнимых единицах.

Для проведения биохимических анализов собиралась цельная кровь во все дни проведения исследования Уровни ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ, и ГМКСФ в образцах плазмы измеряли с помощью стандартного метода твердофазного иммуноферментного анализа ELISA согласно инструкции производителя («Набор для определения свиного ЭПО»: MyBioSource; ELISA Kit; MBS269716).

Полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки Excel 2016 и SPSS 13.0 с использованием раздела программы “Анализ данных”, подраздела “Описательная статистика”. В каждой группе для всех признаков вычисляли среднее арифметическое стандартное отклонение и среднюю ошибку среднего арифметического. Достоверность различий между средними значениями определяли по статистическому t критерию Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патогенез миелоидных клеток ПК и КМ свиней в норме и при АЧ. Популяционный, морфометрический и цитохимический анализ миелоидных клеток ПК и КМ свиней в контроле и в динамике острой формы АЧ

Исследования количественного и качественного состава клеточных элементов системы кроветворения, и, в частности, популяции миелоидных клеток очень важны, т.к. они являются доступными и важными индикаторами нарушений в системе кроветворения и функционирования форменных элементов крови и позволяют обнаружить их изменения при определенных патологических состояниях.

Популяционный анализ основных клеток крови показал, что в норме большую часть лейкоцитов ПК здоровых свиней (около 55%) составляют лимфоциты, а на палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы в сумме приходится примерно 35% популяции лейкоцитов, которые представлены сегментоядерными и палочкоядерными клетками. Последние составляют не более 8% нейтрофилов ПК здоровых свиней, а на метамиелоциты приходится около 1% популяции.

Как видно из таблицы 1, уже с первых суток в ПК наблюдается уменьшение числа сегментоядерных нейтрофилов на 17.0%, а число палочкоядерных нейтрофилов увеличивается на 40%, в то время как количество метамиелоцитов увеличивается более чем в 6 раз и впервые появляются промиелоциты, число которых приближается к 2.0%. На 2 день после инфекции (дпи) количество сегментоядерных нейтрофилов, продолжая уменьшаться, к терминальной стадии становится более чем в 3 раза меньше, чем в контроле. При этом процент палочкоядерных нейтрофилов вплоть до 5 дпи плавно повышается и на 5 дпи в 4 раза превосходит их количество по сравнению с контролем. В дальнейшем, к терминальной стадии их процент несколько уменьшается, хотя продолжает превосходить их число по сравнению с контролем в 2,5 раза. В то же время число метамиелоцитов на всем протяжении заболевания значительно возрастает и к завершающей стадии болезни составляют около трети всей миелоидной популяции в периферической крови. Наиболее ранние формы миелоидных клеток, а именно промиелоциты и миелобласты, которые не встречаются в ПК здоровых свиней, появляются в незначительном количестве уже на 1 дпи, а затем, плавно увеличиваясь, к концу болезни суммарно составляют около 20% от всей популяции миелоидных клеток крови.

Таким образом, с первого дня после заражения нами выявлен сдвиг миелоидной популяции влево, что проявилось как значительным увеличением числа метамиелоцитов,

© National Library of Armenia

так и появлением промиелоцитов в ПК, зараженных АЧ свиней. В дальнейшем эта тенденция сохраняется и увеличивается число незрелых и наиболее молодых из распознаваемых морфологически клеток крови. Уже со 2 дпи происходят изменения в содержании нейтрофилов – впервые их количество достоверно снижается, в результате чего, можно полагать, что пролиферативная фаза начинает сменяться дегенеративной, несмотря на преобладание ранних форм – палочкоядерных нейтрофилов и более ранних форм вплоть до миелобластов.

Таблица 1.

Распределение миелоидных клеток по степени зрелости в ПК свиней при острой форме АЧ (%)

Типы клеток	Контр.	1 дпи	2 дпи	3 дпи	4 дпи	5 дпи	6 дпи	7 дпи
Миелоидные клетки	34.7±3.9	27.1±2.6	20.5±1.9*	19.5±2.0*	14.4±1.2*	14.7±1.4*	14.6±1.3*	12.3±1.4*
Миелобласты	-	-	0.3±0.1	1.1±0.1 **	2.2±0.2**	2.1±0.2**	3.3±0.4**	4.1±0.8*
Промиелоциты	-	1.6±0.1**	3.9±0.8**	5.7±1.0**	8.2±0.8**	11.1±1.7**	12.0±2.2**	13.8±3.1**
Метамиелоциты	1.2±0.3	8.2±1.2**	14.7±1.9**	15.7±3.4**	21.5±3.9**	23.6±4.1**	27.4±4.0**	34.2±4.2**
Палочкоядерные нейтрофилы	7.5±2.7	12.5±2.4	18.3±2.6**	20.9±2.8**	22.2±3.7**	29.3±4.4**	24.9±5.3**	20.2±4.1**
Сегментоядерные нейтрофилы	91.3±9.8	77.7±10.2	62.8±10.5	56.6±11.3*	45.9±10.7*	33.9±12.7*	32.4±11.4*	27.7±5.1*

*достоверно ниже по сравнению с контролем ($p<0.05$-0.01)
**достоверно выше по сравнению с контролем ($p<0.05$-0.01)

Это свидетельствует о завершении и/или несостоятельности компенсаторной фазы миелопоэза, а, следовательно, и углублении патологических процессов. Изменение лейкоцитарной формулы сопутствует многим заболеваниям и дает представление о тяжести состояния животных. Такое изменение лейкограммы с увеличением процентного содержания молодых форм миелоидных клеток называют сдвигом влево.

Таблица 2.

Распределение миелоидных клеток КМ свиней по степени зрелости в при острой форме АЧ (%).

Типы клеток	Контр.	2 дпи	3 дпи	4 дпи	5 дпи	6 дпи	7 дпи
Миелоидные клетки	23.7±2.1	13.1±0.8*	15.9±2.2*	15.2±1.8*	14.4±1.5*	12.8±1.2*	10.3±1.0*
Миелобласты	6.7±1.1	5.2±0.9	4.6±1.0	3.9±0.9*	4.1±1.3	4.3±1.2	3.7±0.9*
Промиелоциты	7.7±1.5	14.3±3.3**	9.3±2.0	9.8±2.4	9.2±2.1	9.5±1.9	13.6±3.0**
Метамиелоциты	22.5±4.7	24.7±4.2	25.8±2.9	27.7±5.1	32.6±5.3	45.2±5.7**	47.9±5.2**
Палочкоядерные	8.6±2.2	16.9±3.8	29.0±3.6**	25.5±3.4**	23.2±3.2**	21.8±3.8**	18.0±2.9**
Сегментоядерные	54.0±4.1	35.1±4.4*	24.7±3.5*	27.2±3.6*	23.3±3.7*	11.9±2.8*	6.6±1.4*
Патологические нейтрофилы	0.5±0.1	3.8±0.8**	4.7±1.2**	5.8±2.3**	7.6±3.4**	7.4±3.2**	10.2±2.8**
Суммарно ранние формы клеток	36.9±3.6	44.2±4.7	42.6±4.2	41.4±5.5	45.9±5.2	59±5.4**	65.2±7.1**

*достоверно ниже по сравнению с контролем ($p<0.05$ - $p<0.001$)
** достоверно выше по сравнению с контролем ($p<0.05$ - $p<0.001$)

© National Library of Armenia

В норме соотношение палочки/сегменты составляет примерно 0.3, и достоверная разница с контролем проявляется уже к 48 часам после инфекции, когда начинает наблюдаться инверсия соотношения палочки/сегменты с преобладанием палочковидных форм нейтрофилов, которая, достигая пика к 4 дпи, сохраняется на уровне 2.6 вплоть до терминальной фазы заболевания, графическое представление которого дано ниже вместе с данными костного мозга (рис. 1). На недостаточность пролиферационных механизмов указывает и снижение содержания всех клеток крови – панцитопения, что свидетельствует о несостоятельности компенсаторной фазы лейкопоэза, несмотря на резкое омоложение популяции нейтрофилов ПК уже на ранних сроках заболевания.

Такое соотношение появляется при повышенной потребности организма животного в нейтрофильных лейкоцитах, превышающее возможности КМ. Сдвиг влево часто наблюдается при различных тяжелых заболеваниях, а в нашем случае и при АЧС, что может иметь прогностическое значение Начиная с 6-го дпи и на 7 дпи, становятся заметными показатели, указывающие на декомпенсацию пролиферативной активности организма свиней с острой формой АЧС. Это проявляется постепенным снижением не только нейтрофилов, но и числа лимфобластов и монобластов. При этом происходит достоверное увеличение содержания мертвых и разрушающихся клеток, число которых на терминальной стадии составляет около половины популяции клеток ПК. Проведенный анализ распределения миелоидных клеток КМ свиней по степени зрелости в норме и при АЧС выявил незначительное увеличение числа ранних форм миелоидных клеток, которое сохраняется вплоть до терминальной стадии развития болезни и к 7 дпи почти в два раза превышает их количество по сравнению с контролем. Важно отметить, что при этом основное место среди популяции миелоидных клеток занимают метамиелоциты (табл. 2).

Определение костномозгового индекса созревания миелоидных клеток показал, что у здоровых свиней он равен 0,59 и находится в пределах нормы. При этом уже на вторые сутки заболевания число ранних форм миелоидных клеток начинает повышаться, по сравнению с контролем, что свидетельствует о наличии резерва предшественников миелоидных клеток костного мозга. Начиная с пятых суток костномозговой индекс резко повышается и к терминальной стадии достигает 2,7, т.е. происходит резкое омоложение миелоидных клеток, а число патологичных миелоидных клеток увеличивается до 10%. В процессе заболевания число палочкоядерных нейтрофилов постепенно увеличивается и к терминальной стадии почти в два раза превосходят их число в контроле. При этом количество сегментоядерных нейтрофилов на всем протяжении заболевания уменьшается и к терминальной стадии их число более, чем в 8 раз уменьшается по сравнению с контролем, достигая на терминальных стадиях 65% популяции (рис. 1).

Как известно в КМ могут наблюдаться регенеративный или дегенеративный сдвиги популяции нейтрофилов. При регенеративном сдвиге нейтрофилов увеличивается количество палочкоядерных и ранних миелоидных клеток на фоне лейкоцитоза. Это говорит о повышенной деятельности костного мозга. При дегенеративном сдвиге увеличивается количество только палочкоядерных нейтрофилов; при этом появляются дегенеративные изменения в клетках. Наши исследования указывают, что на ранних стадиях заболевания (1-3 дпи) происходит регенеративный сдвиг нейтрофилов в КМ. В дальнейшем он сменяется дегенеративным сдвигом. Эти изменения отражаются в популяции нейтрофилов ПК – на раннем этапе заболевания в крови также отмечено повышение палочкоядерных нейтрофилов и метамиелоцитов. Это приводит к кратковременному росту числа нейтрофилов в крови. Затем, вследствие недостаточности этих процессов, возникает описанная нами нейтропения. Для объяснения нейтропении, выявленной в крови больных свиней в периоде с 4 по 7 дпи, мы исследовали индекс созревания нейтрофилов в миелограммах. Для человека разработан индекс сдвига

© National Library of Armenia

нейтрофилов КМ который определяется по формуле ИС = (М + Ю + П) / С. Нормальный индекс сдвига нейтрофилов выражается в величинах 0,05—0,08. Его изменение указывает на степень тяжести болезни: так, при индексе 1,0 и более — тяжелая степень; в пределах 0,3— 1,0 — болезнь средней степени тяжести; при индексе 0,3 и меньше — степень заболевания легкая Наши данные по изучению миелограммы показали, что индекс сдвига нейтрофилов, в КМ при АЧС, начиная со 2 дпи, колебался в пределах 2.1-3.6, что свидетельствует о тяжелом функциональном угнетении КМ. Следовательно, помимо снижения численности миелоидных клеток происходит угнетение их пролиферативной активности в КМ при острой АЧС.

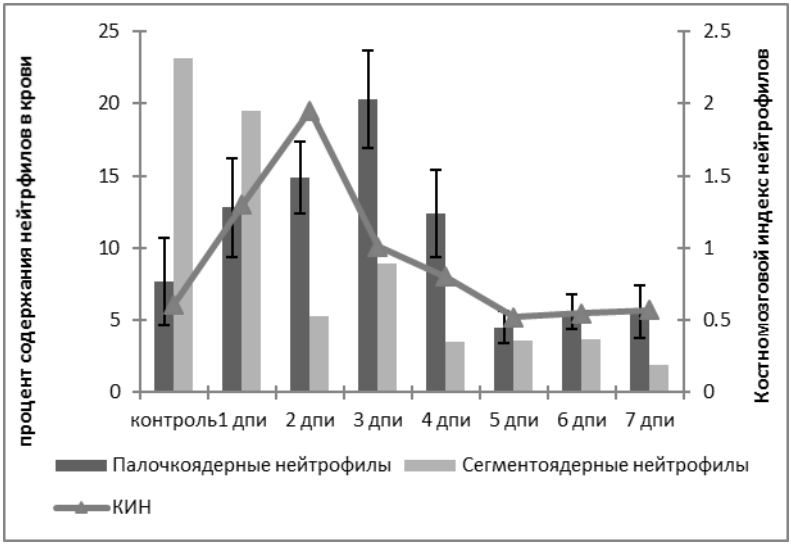

Рисунок 1. Динамика изменений соотношения числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов при острой форме АЧС

Итак, в течение первых трех суток болезни костномозговой индекс созревания нейтрофилов находится в пределах нормы, что говорит о наличии в костном мозге резерва ранних миелоидных клеток, а, начиная с пятых суток, он резко повышается и к терминальной стадии уже в 3,5 раза превышает допустимые пределы, что свидетельствует о резком омоложении миелоидной популяции костного мозга.

При этом на вторые сутки болезни происходит недостоверное увеличение числа ранних форм миелоидных клеток на фоне незначительного лимфоцитоза, т.е. происходит омоложение миелоидных клеток, что свидетельствует о регенеративном сдвиге нейтрофилов и говорит о повышенной деятельности костного мозга, С 3 дпи и до конца болезни он заменяется дегенеративным сдвигом миелоидной популяции, когда происходит значительное увеличение числа палочкоядерных и дегенеративных нейтрофилов, что свидетельствует об угнетении функции костного мозга, а на терминальной стадии заболевания дегенеративный сдвиг нейтрофилов усугубляется и число сегментоядерных нейтрофилов уменьшается более чем в 8 раз, а число патологичных миелоидных клеток достигает 10%. Такой сдвиг нейтрофилов на фоне лейкопении скорее всего свидетельствует о развитии вирусной инфекции.

Размерные показатели палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в контроле почти не отличаются друг от друга. С первых суток размеры нейтрофилов и

© National Library of Armenia

метамиелоцитов недостоверно уменьшаются и появляются в небольшом количестве промиелоциты, а со вторых суток обнаруживаются миелобласты - самые крупные клетки миелоидного ряда в ПК. Цитоморфометрический анализ всех клеток ПК больных свиней выявил не только резкое омоложение клеток миелоидного ряда, вплоть до появления миелобластов, но и недостоверное уменьшение площади и содержания РНК в них, что возможно связано с вынужденным выбросом из КМ не закончивших созревание миелобластов. В то же время размеры промиелоцитов и содержание в них РНК вплоть до терминальной стадии заболевания значительно увеличиваются, а в метамиелоцитах и нейтрофилах сохраняется тенденция к незначительному увеличению, как размеров, так и содержания РНК в их структурах. При сравнении изменений площадей исследуемых клеток и содержания в их структурах РНК оказалось, что они прямо пропорциональны.

Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток ПК и КМ при острой форме АЧС.

Известно, что все ядерные формы клеток ПК млекопитающих, и в том числе здоровых свиней, терминально дифференцированы и диплоидны. Исследование популяционного состава ПК здоровых свиней показал, что в нем, практически, отсутствуют незрелые формы гемопоэтических клеток. Количество метамиелоцитов не превышает 1.0%, но уже с первых дней болезни их число резко возрастает и появляются промиелоциты. На рисунке 2 приведены данные по содержанию ДНК в ядрах ранних форм миелоидных клеток по классам плоидности при АЧС, которые представлены в виде гистограмм их распределения по классам плоидности (рис. 2 А-Ж). Как видно из рисунка в 1 дпи ранние формы миелоидных клеток представлены диплоидными, гипердиплоидными и тетраплоидными клетками. В течение заболевания вплоть до терминальной стадии такое распределение миелоидных клеток сохраняется (рис. 2 Б, В, Г). Меняется лишь соотношение диплоидных и триплоидных клеток, но при этом сохраняется преобладание диплоидных клеток, а к завершающей стадии

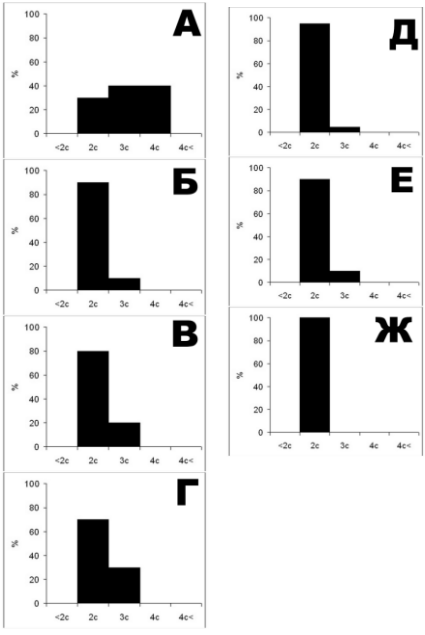

Рисунок 2. Распределение ядер ранних миелоидных клеток (суммарно) свиней ПК по классам плоидности в динамике острой формы АЧС.
По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах "с"
По оси ординат – частота встречаемости
А. – 1 дпи, Б. –2 дпи, В – 3 дпи, Г –4 дпи, Д –5 дпи, Е –6 дпи, Ж –7 дпи.

© National Library of Armenia

остаются только диплоидные клетки (рис. 2 Ж).

На рисунке 3 приведена динамика изменений в распределении ядер нейтрофилов ПК по классам плоидности. На гистограмме палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы представлены суммарно в виду того, что их ядра мало отличаются друг от друга по содержанию ДНК в популяции появляются в небольшом количестве гипердиплоидные ядра (рис.3 Б, В) а на завершающей стадии болезни, появляются и гиподиплоидные нейтрофилы, что свидетельствует о гибели части нейтрофилов на завершающих стадиях болезни. Появление на 7 дпи тетраплоидных нейтрофилов возможно связано с обнаруженными нами гигантскими нейтрофилами, в которых количество ДНК выше, чем в нормальных диплоидных нейтрофилах. С увеличением сроков заболевания на 3, 4, 5, 6 и 7 дпи последние полностью исчезают, и вся популяция нейтрофилов представлена диплоидными клетками, но на терминальной стадии появляются в небольшом количестве гиподиплоидные нейтрофилы, что свидетельствует о гибели части нейтрофилов на завершающих стадиях болезни (З Ж).

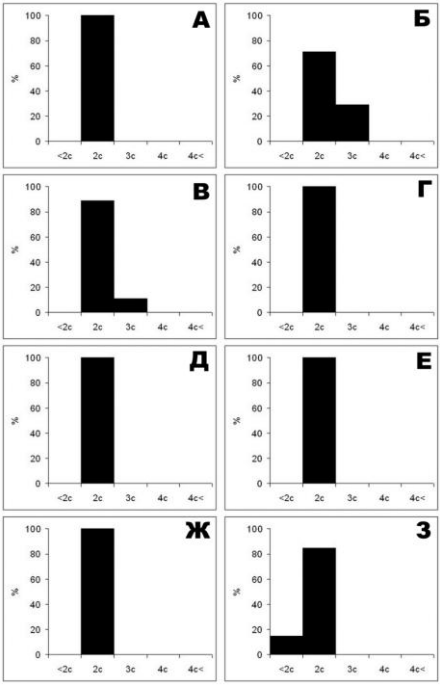

Рисунок 3. Распределение ядер нейтрофилов ПК свиней по классам плоидности в контроле и в динамике острой формы АЧС.
А-контроль, Б-1 день после заражения, В-2 день после заражения, Г-3 день после заражения, Д-4 день после заражения, Е-5 день после заражения, Ж-6 день после заражения, З-7 день после заражения.

Как и следовало ожидать, определение среднего содержания ДНК выявило, что все дифференцированные миелоидные клетки свиней диплоидны и лишь небольшой процент приходится на триплоидные клетки, причем они встречаются не на всех стадиях развития болезни.

На рисунке 4 представлены гистограммы распределения ранних форм миелоидных клеток КМ по классам плоидности. Наши данные свидетельствуют, что у здоровых свиней ранние формы миелоидных клеток КМ составляют около трети всех клеток данной популяции и по содержанию ДНК представлены диплоидными (60%) и синтезирующими ДНК (40%) клетками (рис.4 А). В течение заболевания вплоть до терминальной стадии такое распределение ранних миелоидных клеток КМ сохраняется (рис. 4 Б, В, Г). Меняется лишь соотношение диплоидных и триплоидных клеток, но при

© National Library of Armenia

этом сохраняется преобладание диплоидных клеток. На терминальной стадии появляются гиподиплоидные клетки, что скорее всего является свидетельством гибели части миелоидных клеток на завершающей стадии заболевания (рис. 4 Д).

На рисунке 5 приведена динамика изменений в распределении ядер нейтрофилов по классам плоидности.

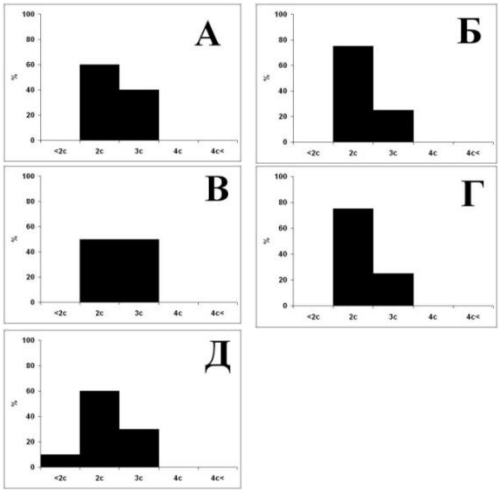

Рисунок 4. Распределение ядер ранних миелоидных клеток (суммарно) КМ свиней по классам плоидности в динамике острой формы АЧС.
По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”
По оси ординат – частота встречаемости
А. – контроль, Б. –2 дпи, В – 3 дпи, Г –4 дпи, Д –5 дпи, Е –6 дпи, Ж –7 дпи.

Появление на 7 дпи тетраплоидных нейтрофилов возможно связано с обнаруженными нами гигантскими нейтрофилами, в которых количество ДНК выше, чем в нормальных диплоидных нейтрофилах.

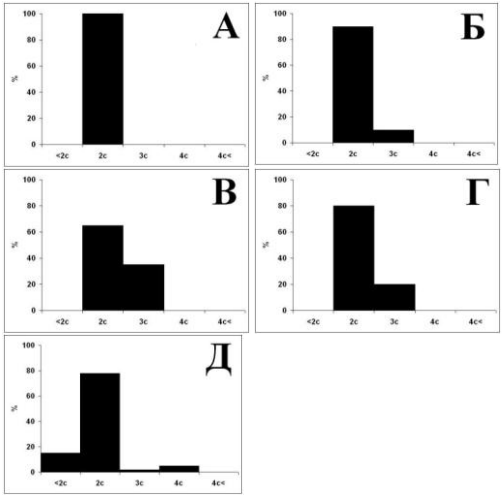

Рисунок 5. Распределение ядер нейтрофилов (суммарно) костного мозга свиней по классам плоидности в контроле и в динамике острой формы АЧС.
По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”
По оси ординат – частота встречаемости
А. – контроль, Б. –2 дпи, В – 3 дпи, Г –4 дпи, Д –5 дпи, Е –6 дпи, Ж –7 дпи.

На гистограмме палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы представлены суммарно в виду того, что их ядра мало отличаются друг от друга по содержанию ДНК и в контроле все нейтрофилы диплоидны (рис. 5 А), однако с первых дней болезни и

© National Library of Armenia

вплоть до терминальной стадии заболевания в популяции появляются в небольшом количестве гипердиплоидные ядра (рис. 5 Б, В, Г), а на завершающей стадии болезни, появляются в небольшом количестве гиподиплоидные нейтрофилы, что свидетельствует о гибели части нейтрофилов на завершающих стадиях болезни.

Популяционный анализ и динамика транскрипционной активности миелоидных клеток ПККМ свиней без и при действии вируса АЧ.

Изучение ПККМ свиней является удобной моделью для исследования некоторых сторон патогенеза АЧС, и, в частности, дифференцировки и транскрипционной активности различных гемо- и иммунопоэтических клеток. В данной работе исследовались популяционные показатели миелоидных клеток ПККМ, их выживаемость и транскрипционная активность, т.к. они являются источником дополнительной репликации вируса и играют решающую роль в иммунной защите против бактериальных и вирусных патогенов, а также участвуют в развитии воспалительной реакции. Отсюда и необходимость изучения особенностей выживания и динамики транскрипционной активности миелоидных клеток свиней в процессе культивирования и при действии на них вируса АЧС. Исследование изменений в популяционном составе основных идентифицируемых клеток ПККМ свиней выявило, что через 24 часа от начала культивирования в ПККМ интактной взрослой свиньи живыми оказалось около половины всех гемо- и иммуннопоэтических клеток, из которых преобладающими явились (33%) клеточные элементы белой крови, а на долю эритроидных клеток пришлось около 18% популяции живых клеток культуры. Основную массу клеток белой крови составляла лимфоидная популяция (почти 20%), в то время как на миелоидные клетки пришлось всего около 3% живых клеток культуры крови. В процессе культивирования процент живых клеток уменьшился более чем в 3.5 раза и к 96 часам их оказалось менее 15%, среди которых около 2% составляли миелоидные клетки. Фактически наблюдалась более или менее равномерная гибель клеток как белого, так и красного ростка. При этом процент ранних незрелых клеток (монобласты, миелобласты, лимфобласты, проэритробласты) снижался намного интенсивнее. Причина большей лабильности ранних форм клеток ПККМ возможно объясняется как их меньшей устойчивостью, так и созреванием-дифференцировкой.

Таблица 3.

Распределение миелоидных клеток ПККМ свиней по степени зрелости в норме и при острой форме АЧ (%).

Типы клеток	1 контр.	1 АЧС	2 контр.	2 АЧС	3 контр.	3 АЧС	4 контр.	4 АЧС
Миелоидные кл.	2.7±0.5	4.2±1.5	5.2±0.5	6.3±0.9	4.8±0.4	3.9±0.3*	2.3±0.3	1.8±0.2 [a]
Миелобласты	10.7±1.2	3.5±0.3*	3.9±0.2	3.7±0.7	3.7±0.1	-*	-	-
Промиелоциты	17.6±1.5	14.0±1.0	10.7±0.9	6.6±1.8*	6.4±0.9	5.4±0.3	5.4±1.1	5.7±1.4
Метамиелоциты	39.3±8.8	27.6±4.2 [a]	26.6±7.0	21.2±4.3	22.2±4.8	17.3±4.9	19.4±3.7	15.8±1.9
Палочкоядерные	19.6±5.2	25.9±3.7 [a]	18.3±2.7	26.8±5.7 [a]	24.6±2.7	32..±3.6**	29.4±3.1	24.5±5.1
Сегментоядерные	12.5±2.0	29.0±3.4**	40.5±8.1	41.7±8.7	43.1±7.2	45.1±7.4	45.8±6.1	54.0±7.3 [a]

*достоверно ниже по сравнению с контролем ($p<0.05$-0.01)

**достоверно выше по сравнению с контролем ($p<0.05$-0.01)

[a] тенденция ($p<0.1$)

© National Library of Armenia

Исследование распределения миелоидных клеток ПККМ свиней по степени зрелости выявило, что в контроле около 40% всех миелоидных клеток культуры составляют метамиелоциты (табл. 3). Как видно из таблицы, наиболее ранние формы миелоидных клеток, начиная со вторых суток культивирования, значительно и достоверно уменьшаются, включая и метамиелоциты, но при этом более чем в 4 раза увеличивается количество нейтрофилов. Уже к 3-им суткам наиболее ранние миелоидные клетки – миелобласты, полностью исчезают, а число промиелоцитов и метамиелоцитов уменьшаются в 3 и 2,5 раза соответственно. При внесении в среду ПККМ вируса АЧС в различных клетках белой крови он реплицируется с возрастанием титра до 10^6 $ГАЕ_{50}$/мл.

Репликация вируса уже через сутки после его введения в среду сопровождается достоверным уменьшением по сравнению с контролем количества всех основных форм клеток крови, за исключением миелоидных клеток ($p<0.05$), включая и число разрушенных клеток. Важно отметить, что число разрушенных клеток к 96 часам культивирования с вирусом АЧС не более чем на 15% превышало их количество в контроле (табл. 3). Уже через 24 часа культивирования с вирусом АЧС общее количество миелоидных клеток увеличивается более, чем в 1.5 раза. Однако резко уменьшается количество наиболее ранних миелоидных клеток, особенно миелобластов и промиелоцитов, число же нейтрофилов увеличивается в среднем в 1.7 раз. При этом количество сегментоядерных нейтрофилов более чем в два раза превышает их число в контроле. По мере культивирования клеток с вирусом уже на первые и вторые сутки количество миелобластов уменьшается втрое по сравнению с контролем, а затем последние полностью исчезают. Количество промиелоцитов и метамиелоцитов на протяжении культивирования плавно, но недостоверно уменьшается.

Исследование динамики изменений размеров основных клеток ПККМ в течение четырех суток культивирования показало, что среди миелоидных клеток наиболее крупными, превышающими размеры ранних миелоидных клеток в среднем на 30%, являются сегментоядерные нейтрофилы. Важно заметить, что в течение всего срока культивирования размеры всех видов ранних миелоидных клеток в контроле, в том числе площадь их ядер и ядрышек достоверно уменьшаются, за исключением метамиелоцитов, площадь клеточных структур которых также уменьшается, но недостоверно (p 0.5). В то же время размеры палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов на протяжении всего срока культивирования в контрольной группе достоверно уменьшается. При введении вируса в среду площадь ранних миелоидных клеток и нейтрофилов вплоть до третьих суток включительно не меняется, однако по сравнению с соответствующим контролем уже на вторые сутки размеры палочкоядерных нейтрофилов достоверно увеличивается, и эта тенденция сохраняется до конца культивирования

Соответственно изменениям площади клеток меняется и площадь ядер, а содержание РНК как в цитоплазме, так и в ядре всех исследованных клеток меняется аналогично изменениям размеров клеток. Как и следовало ожидать, наибольшее количество РНК было выявлено в ядрах ранних клетках миелоидного ряда ПККМ, т.е. в тех клетках, которые способны к делению. Соответственно в ядрах этих клеток содержится больше РНК, чем в более дифференцированных клетках. В течение первых трех суток культивирования количество РНК в ядре и цитоплазме всех исследованных клеток увеличивается, а на четвертые сутки оно резко падает.

Таким образом, проведенное нами исследование выявило резкое снижение жизнеспособности клеток ПККМ к 4-м суткам культивирования. При этом наиболее лабильными оказались ранние формы клеток КМ. Следовательно, к концу культивирования наблюдается снижение размеров практически всех миелоидных клеток

© National Library of Armenia

и соответственно уменьшение содержания РНК в них. Последнее говорит об угнетении метаболических процессов в клетках ПККМ к 96 часам инкубации. Выявленные нами данные о тенденции к более выраженному увеличению размеров цитоплазмы по сравнению с ядром миелоидных клеток и нейтрофилов хорошо согласуются с литературными данными, свидетельствующими об увеличении размеров цитоплазмы по сравнению с ядром при активации лимфоцитов.

Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток ПККМ свиней без и с воздействием вируса АЧ.

Как видно из гистограммы (рис. 6, А), через 24 часа от начала культивирования популяция ранних миелоидных клеток представлена диплоидными, триплоидными и тетраплоидными клетками. При этом к 48 часам культивирования тетраплоидные клетки исчезают, а диплоидные составляют более 60% популяции. Через 72 и 96 часов в ПККМ свиней определяются только диплоидные миелоидные клетки.

Распределение ядер миелоидных клеток по классам плоидности при воздействии на них вирусом африканской чумы (рис. 6, Б), выявило, что на всех сроках культивирования нейтрофилы представлены диплоидными клетками и только через 96 часов культивирования имеется небольшой процент гиподиплоидных клеток, что свидетельствует о гибели около 30% миелоидных клеток под действием вируса АЧС.

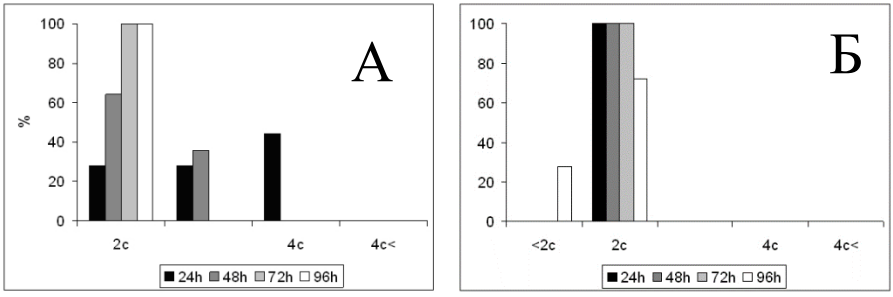

Рисунок 6. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах ранних миелоидных клеток ПККМ свиней (суммарно) в течение 4-х суток культивирования в контроле (А) и при воздействии вируса АЧ (Б)

По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”
По оси ординат – частота встречаемости

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ И ГМ-КСФ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ОСТРОЙ ФОРМЕ АЧС.

Как следует из графика (рис.7, А), в норме и на начальном этапе АЧС в ПК свиней количество ИЛ-17 колеблется в пределах 45 – 70 пкг/мл, а затем уровень ИЛ-17 достоверно увеличивается, колеблясь в пределах 85-100 пкг/мл ($p<0.05$). На 2-3 дпи уровень ИЛ-17 несколько снижается и наблюдается лишь тенденция к росту по сравнению с контролем ($p<0.1$). А на заключительном (4-6 дпи) этапе заболевания уровень цитокина снижается вплоть до контрольных значений.

ИЛ-23 секретируется активированными терминально дифференцированными макрофагальными клетками. ИЛ-23 человека (рис.7, Б) стимулирует индуцированную ФГА продукцию ИНФ-гамма Т-клетками и Т-клетками памяти. На рисунке 7 (Б) видно, что у здоровых свиней содержание ИЛ-23 колеблется в диапазоне от 4.5 до7 пкг/мл. Непосредственно после начала инфекции АЧС наблюдается тенденция к повышению

© National Library of Armenia

содержания ИЛ-23 в сыворотке больных свиней ($p<0.1$) а затем вплоть до конца заболевания, содержание данного цитокина в сыворотке крови достоверно растет ($p<0.05$). При этом на терминальных сроках заболевания его уровень почти в три раза превышает контрольные значения.

Из рисунка 7 (В) следует, что в норме у свиней уровень ГКСФ колеблется в пределах 15-18 пкг/мл.

При АЧС его уровень поднимается и уже на 3 дпи становится достоверным по сравнению с контролем и превосходит контрольные значения в 4-5 раз ($p<0.05$). Однако на терминальной стадии заболевания уровень ГКСФ не отличается от контроля.

Проведенный нами корреляционный анализ между основными показателями состояния миелоидных клеток, такими как популяционный анализ клеток ПК и КМ, и их размерами выявил обратную корреляцию между популяциями ранних и поздних миелоидных клеток. Наиболее информативными оказались данные по корреляции ИЛ-23 с миелоидными клетками, которые обратно коррелируют с численностью зрелых нейтрофилов и демонстрируют положительную корреляцию с популяцией ранних миелоидных клеток, и с площадью их цитоплазмы, т.е. с активацией последних. Из остальных цитокинов Ил-17 дает положительную корреляцию с площадью цитоплазмы ранних миелоидных клеток КМ, т е с активацией последних.

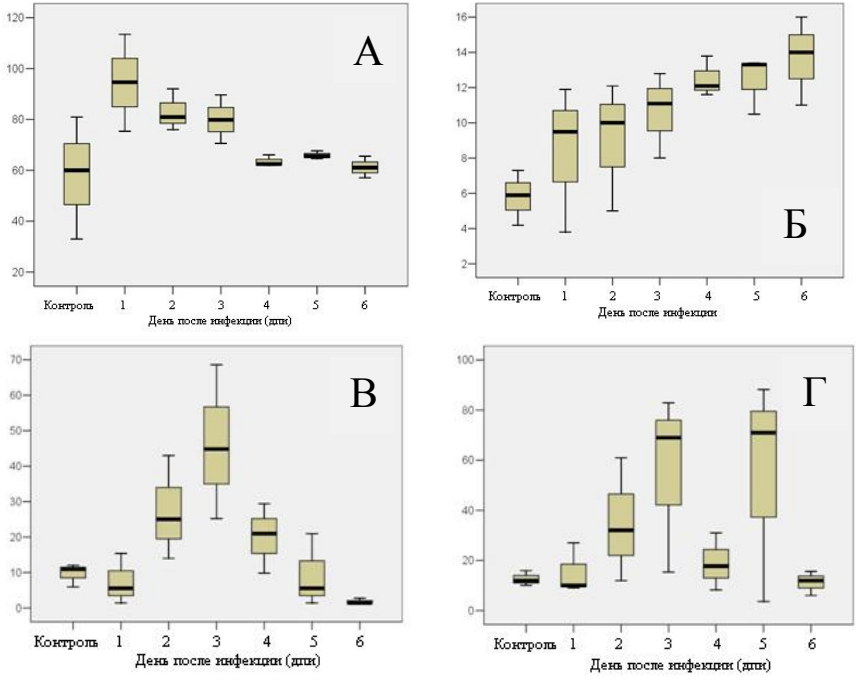

Рисунок 7. Динамика изменений содержания ИЛ-17, ИЛ-23, ГКСФ и ГМКСФ. в ПК свиней в динамике острой формы АЧС (в пкг/мл)

По оси абсцисс – сутки после заражения АЧС,

По оси ординат–количество ИЛ-17 (А), ИЛ-23 (Б), ГКСФ (В) и ГМКСФ (Г) в пкг/мл.

© National Library of Armenia

Оказалось также, что зрелые миелоидные клетки в ПК и КМ снижаются практически одинаково, что свидетельствует о масштабной убыли нейтрофилов в организме свиней, начиная с начальной стадии АЧС. Увеличение доли незрелых миелоидных клеток в крови свиней не сопровождается их значимым возрастанием в КМ, что свидетельствует об ускоренном вымывании данных клеток из КМ в кровь, скорее всего для компенсации убыли и вероятно является результатом действия Ил-17. Ил-23 в данном случае является синергистом, и усиливает действие ИЛ-17, что характерно для ряда воспалительных инфекционных процессов. При этом действие ИЛ-17 более выражено на наиболее раннем этапе инфекционного процесса, что и продемонстрировано нами в связи с ранними популяционными изменениями.

Следующим цитокином, влияющим на физиологические и популяционные характеристики, является ГКСФ (рис.7, В), который является главным гемопоэтическим фактором роста, регулирующим гранулоцитопоэз. ГКСФ обеспечивает пролиферацию, дифференцировку и терминальное созревание миелоидных предшественников нейтрофильных гранулоцитов, а также стимулирует разнообразные функции зрелых нейтрофилов и увеличивает продолжительность их жизни. ГКСФ играет важную роль в регуляции гранулоцитопоэза как в норме, так и в условиях активации гранулоцитопоэза при инфекции. Нами показано также, что подъем сывороточного уровня ГКСФ происходит в разгар заболевания на 3 дпи, после чего его концентрация снижается до контрольных значений.

Данные по динамике сывороточных уровней гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ) в динамике АЧС представлены на рисунке (7, Г), из которого видно, что в норме у свиней уровень ГМКСФ колеблется в пределах 15-18 пкг/мл. При АЧС наблюдается подъем его уровня, который на 3 и 5 дпи становится достоверным по сравнению с контролем. На этих сроках уровень ГКСФ в сыворотке превосходит контрольные значения в 4-5 раз ($p<0.05$). Для АЧС характерны резкие колебания уровней ГМКСФ в сыворотке.

Таким образом, действие цитокинов можно разобрать на две части – раннее и позднее. Ранее проявляется на начальном этапе заболевания – это прежде всего резкий подъем уровня ИЛ-17, который продуцируется активированными Т-лимфоцитами (в частности Th17 клетками). Вероятнее всего именно его действием можно объяснить эффекты, происходящие в миелоидной популяции при АЧС. Как известно ИЛ-17 является важнейшим фактором, вызывающим миграцию нейтрофилов из крови в ткани.

ИЛ-23 отвечает за дифференцировку Т-хелперов, синтезирующих ИЛ-17, по провоспалительному пути. Нами показано увеличение его содержания в ПК с первых дней и продолжается до конца заболевания. Однако его эффект, направленный на повышение уровня Ил-17, оказывается весьма кратковременным, вероятно вследствие выраженной лимфопении, развивающейся в динамике АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обобщая все вышесказанное, можно прийти к заключению, что при острой форме АЧС в миелопоэзе происходят сложные изменения как в популяции нейтрофилов, так и в популяции ранних форм миелоидных клеток, которые отсутствуют в норме в ПК. Был выявлен выраженный сдвиг миелоидной популяции влево и если на 1 дпи он был равен 0,3, затем, неуклонно нарастая, к завершающим стадиям достиг 2.6. Такое соотношение появляется при повышенной потребности организма животного в нейтрофильных лейкоцитах, превышающее возможности костного мозга, Сдвиг влево часто наблюдается при тяжелых инфекционных заболеваниях, а в нашем случае и при АЧС, что может иметь прогностическое значение. Достоверное снижение числа

© National Library of Armenia

нейтрофилов, которое начинается с третьих суток, вероятнее всего связано с тем, что пролиферативная фаза миелопоэза начинает меняться дегенеративной, несмотря на преобладание ранних форм миелоидных клеток. Это свидетельствует о завершении и/или несостоятельности компенсаторной фазы миелопоэза, а, следовательно, и углублении патологического процесса. При этом происходит достоверное увеличение содержания мертвых и разрушающихся клеток, число которых на терминальной стадии составляет около половины популяции клеток ПК свиней. Индекс сдвига нейтрофилов в миелограмме КМ свиней колеблется в пределах 2.1-3.6, что свидетельствует о тяжелом функциональном угнетении костного мозга.

Нами впервые выявлены патологичные миелоидные клетки при инфекции АЧС, которые были обнаружены в КМ и ПК. Наличие патологичных нейтрофилов, отсутствующих у здоровых особей, свидетельствует о сильно выраженной воспалительной составляющей заболевания. Их появление часто связывают с патологическим ответом на активацию иммунной системы, возникающую при некоторых заболеваниях. Однако нами выявлены патологичные нейтрофилы и в условиях *in vitro* уже на 1 дпи, что свидетельствует о наличии независимого от иммунной стимуляции организма механизма возникновения патологичных клеток.

С учетом вышесказанного, можно заключить, что популяционные изменения являются не непосредственно вирус-индуцированными, а ответной реакцией организма на виремию. Значительное уменьшение количества сегментоядерных нейтрофилов к терминальной фазе болезни в ПК и в КМ свидетельствует о прямом их участии в защите внутренней среды организма свиней от вируса АЧС.

Механизмы, запускающие популяционные изменения во всех видах миелоидных клеток ПК и КМ, связаны с достоверным увеличением содержания ИЛ-17 и ИЛ-23.В пользу подобного заключения говорит и то, что увеличению концентрации этих цитокинов в сыворотке крови предшествует нейтропении. Усиление же синтеза Г-КСФ на 3 дпи, происходит после возникновения нейтропении и направлено на усиление пролиферации этих клеток для компенсации их убыли.

Наши исследования помогают уточнить патологию иммунной системы при АЧС. Так, согласно современной концепции развития воспалительного процесса, принимаются три независимых пути его развития - IL-12/IFN-γ, IL-4/IL-5/IL-13 и IL-23/IL-17. В более ранних работах по патогенезу АЧС, рассматривались отдельные компоненты двух первых путей. В настоящей работе рассмотрен и третий путь - IL-23/IL-17. Он более часто развивается при различных формах аутоиммунных процессов. Активация содержания выявленных нами в сыворотке крови интерлейкинов 17 и 23 подтверждает возникновение аутоиммунных процессов у свиней. В случае острой формы инфекции генотипом 2 аутоиммунная патология у свиней не успевает раскрыться в полной мере из-за скоротечности патологического процесса. Однако при хроническом течении болезни или при инфекциях другими генотипами вируса АЧС возможна важная роль аутоиммунных процессов в общей патологии АЧС.

ВЫВОДЫ

1. Популяционный анализ нейтрофилов ПК выявил их смещение влево не только за счет возрастания соотношения палочек/сегментов, но и появления значительного количества ранних форм.
2. При острой форме АЧС в первые дни инфекции в условиях *in vivo* компенсаторная фаза инфекции носит кратковременный характер и сменяется декомпенсацией на более поздних сроках заболевания.

© National Library of Armenia

3. Основной причиной нейтропении при АЧС является миграция преимущественно зрелых гранулярных лейкоцитов в ткани (диапедез). Изменения миелоидной популяции являются не непосредственно вирус-индуцированными, а ответной реакцией организма на виремию.
4. На пике заболевания происходит активация миелоидных клеток, проявляющаяся в увеличении их размеров, и содержания РНК в цитоплазме. Эти процессы наблюдаются практически во всей популяции миелоидных клеток ПК, КМ и ПККМ, но более выражены в метамиелоцитах и нейтрофилах.
5. При инфекции АЧС в ПК и КМ выявлены патологичные миелоидные клетки. Их обнаружение при заражении первичной культуры костного мозга свиньи вирусом АЧС свидетельствует о наличии механизма возникновения патологичных клеток независимо от иммунной системы организма
6. На раннем этапе АЧС, выявлено повышение сывороточных уровней ИЛ-17 и ИЛ-23.
7. Усиление синтеза Г-КСФ на 3 дпи происходит после возникновения нейтропении и направлено на активацию пролиферации этих клеток для компенсации их убыли.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Karalyan Z., Simonyan L., Misakyan A., Abroyan L., Hakobyan L., Avetisyan A., Saroyan D. Cell Development in Primary Culture of Porcine Bone Marrow. // CellBio. 2014; 3:43-49. doi:10.4236/cellbio.2014.32005.
2. Zakaryan H., Karalova E., Voskanyan H., Ter-Pogossyan Z., Nersisyan N., Hakobyan A., Saroyan D., Karalyan Z. Evaluation of hemostaseological status of pigs experimentally infected with African swine fever virus. // Veterinary microbiology. 2014; 174:223-228.
3. Karalova E., Zakaryan H., Voskanyan H., Arzumanyan H., Hakobyan A., Nersisyan N., Saroyan D., Karalyan N., Tatoyan M., Akopian J., Gazaryantz M., Mkrtchyan Z., Pogosyan L., Nersesova L., Karalyan Z. Clinical and post-mortem investigations of genotype II induced African swine fever. // Porcine Research. 2015; 5(1):1-11.
4. Сароян Д.А. Популяционный анализ нейтрофилов периферической крови вдинамике развития африканской чумы свиней (АЧС). // Биолог. журн. Армении. 2015; 67(1):74-79.
5. Сароян Д.А., Симонян Л.Н., Акопян Л.А., Аброян Л.О., Аветисян А.С., Семерджян З.Б. Динамика изменений площади и содержания нуклеиновых кислот в миелоидных клетках периферической крови в процессе острой формы африканской чумы свиней. // Фарма. 2015; 10:32-35.
6. Сароян Д.А., Семерджян З.Б., Аброян Л.О., Аветисян А.С., Акопян Л.А., Каралова Е.М. Популяционный анализ миелоидных клеток костного мозга свиней в динамике развития острой формы африканской чумы. // Кровь. 2015; 19(1):45-49.
7. Арзуманян Г.А., Татоян М.Р., Сароян Д.А. Эмбриональное кроветворение в печени свиньи. // Кровь. 2015; 19(1):50-53.

© National Library of Armenia

Դավիթ Սարոյան Աշոտի

Միելոպոեզի խանգարումները խոզերի սուր աֆրիկյան ժանտախտի զարգացման դինամիկայում

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Առանցքային բառեր՝ Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտ, միելոպոեզ, նեյտրոֆիլներ, միելոիդ բջիջներ, ԻԼ-17, ԻԼ-23, ԳԳԽԳ

Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի բնական պատմության ժամանակակից փուլն ընդգրկում է Աֆրիկայի բնական-օջախային նոզոարեալները և եվրոպական տարբեր երկրներում տեղի ունեցած հիվանդության առանձին բռնկումներն ու էպիզոոտները: 21-րդ դարի սկզբում ԽՍԺ-ի դեպքեր արձանագրվեցին նախ Վրաստանում և ապա՝ Հայաստանում: Հայտնի է, որ հիվանդության հարուցիչը խոշոր, թաղանթավոր, երկշղթա ԴՆԹ պարունակող վիրուս է, որն անկախ տարածման պայմաններից 100%-ով վարակում է ընտանի և վայրի խոզերին և հիվանդության սուր ձևի ժամանակ բերում 100% մահացելիության: Վիրուսն, առաջին հերթին, բազմանում է իմունային համակարգի բջիջներում և հատկապես՝ մոնոցիտ-մակրոֆագային շարքի բջիջներում, որոնք վիրուսի ռեպլիկացիայի առաջնային և հիմնական թիրախն են: Վիրուսը, սակայն, կարող է բազմանալ նաև լեյկոցիտային շարքի այլ բջիջներում, որոնցից առավել կարևորություն ունեն նեյտրոֆիլները, որոնք կարևոր դեր են խաղում օրգանիզմի հակաբակտերիալ և հակավիրուսային պաշտպանության մեջ: Այստեղից բխում է աշխատանքի նպատակը՝ խոզերի սուր աֆրիկյան ժանտախտի ժամանակ հետազոտել ծայրամասային արյան և ոսկրածուծի միելոիդ բջիջների մորֆոֆիզիոլոգիական փոփոխությունները, ուսումնասիրել միելոիդ բջիջների գոյության առանձնահատկությունները ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայում՝ ԽՍԺ-ի վիրուսի հետ կուլտիվացման ժամանակ, ինչպես նաև պարզել հիմնական հակավիրուսային ցիտոկինների ազդեցությունը միելոպոեզի վրա:

Աշխատանքում ցույց է տրվել, որ սուր ԽՍԺ-ի ժամանակ միելոպոեզում տեղի են ունենում բարդ փոփոխություններ, ինչպես նեյտրոֆիլների, այնպես էլ ծայրամասային արյան մեջ նորմայում բացակայող երիտասարդ միելոիդ բջիջների պոպուլյացիաներում: Ցույց է տրվել արտահայտված նեյտրոպենիա, որը ծագում է հիվանդության երկրորդ փուլում և ընթանում է հասուն բջիջների հաշվին: Նեյտրոպենիայի հիմնական պատճառը գերազանցապես հասուն նեյտրոֆիլների գաղթն է հյուսվածքներ: Մեր կողմից չի դիտարկվել փոխհատուցողական պրոլիֆերացիա. չնայած, հասուն միելոիդ բջիջների պոպուլյացիան փոխարինվում

© National Library of Armenia

է ավելի երիտասարդով, բայց նեյտրոֆիլների քանակի կրճատումը չի փոխհատուցվում: Ոսկրածուծում լեյկոպենիայից բացի տեղի է ունենում նաև միելոիդ բջիջների պոպուլյացիայի երիտասարդացում: Անկասկած, այս գործընթացը փաստում է երիտասարդ միելոիդ բջիջների ծայրամասային արյան մեջ արտանետման մասին և օրգանիզմի՝ միելոիդ պոպուլյացիաների քանակը վերականգնելու փորձն է:

3-4 հվօ-ում՝ հիվանդության զարգացման գագաթնակետին, տեղի է ունենում միելոիդ բջիջների ակտիվացում, որն արտահայտվում է այս բջիջների չափերի և ցիտոպլազմայում ՌՆԹ-ի պարունակության աճով: Այս գործընթացները դիտարկվում են միելոիդ բջիջների համարյա բոլոր պոպուլյացիաներում, բայց ավելի արտահայտված են մետամիելոցիտների և հասուն նեյտրոֆիլների մոտ:

In vitro պայմաններում մեր կողմից չեն նկատվել պոպուլյացիոն փոփոխություններ, սակայն ինչպես *in vivo*, այնպես էլ *in vitro* պայմաններում ցույց է տրվել բջիջների ակտիվացում, որն արտահայտվել է այս բջիջների չափերի և ցիտոպլազմայում ՌՆԹ-ի պարունակության աճով: Միելոիդ բջիջների չափերի փոփոխությունը կապված է առաջին հերթին վիրուսային վարակից: Հայտնի է, որ ԽԱԺ-ի վիրուսը՝ հիմնական թիրախ բջիջներն ախտահարելուց հետո կարող է ախտահարել նաև նեյտրոֆիլները, որը համապատասխանում է մեր կողմից ստացված տվյալների հետ:

Վերոնշյալը հաշվի առնելով կարելի է եզրակացնել, որ սուր ԽԱԺ-ի ժամանակ դիտվող պոպուլյացիոն փոփոխությունները պայմանավորված չեն վիրուսով և օրգանիզմի պատասխանն են վիրեմիայի հանդեպ: Միելոիդ բջիջների բոլոր պոպուլյացիաներում փոփոխություններ առաջացնող մեխանիզմները անմիջականորեն կապված են ԻԼ-17-ի և ԻԼ-23-ի պարունակության հավաստի աճի հետ: Այս եզրակացության օգտին է խոսում նաև այն փաստը, որ վերոնշյալ ինտերլեյկինների կոնցենտրացիայի աճին նախորդում է նեյտրոպենիան:

Գ-ԳԽԳ-ի սինթեզի աճը 3 հվօ-ում, տեղի է ունենում նեյտրոպենիայից հետո և ուղղված է միելոիդ բջիջների քանակի անկման փոխհատուցմանը:

SAROYAN DAVIT ASHOTI
STUDIES ON THE PATHOGENESIS OF MYELOPOIESIS
IN ACUTE AFRICAN SWINE FEVER

SUMMARY

Keywords – African swine fever, neutrophils, myolid cells, myelopoiesis, IL-17, IL-23, GCSF

© National Library of Armenia

African swine fever (ASF) is a serious, highly contagious, viral disease of pigs. In the beginning of the 21st century it appeared in Georgia, then in Armenia. It is known that the pathogen of ASF is a large enveloped double-stranded DNA virus. Regardless of how the virus spread, it 100% affects domestic and wild pigs of all ages and causes 100% mortality in its acute form. It replicates in the cells of the immune system, primarily in cells of the monocyte-macrophage series, which are the first and main target of the virus replication. However, the virus is able to replicate in other cells of the leukocyte line, the most important of which are neutrophils, which play a crucial role in the immune defense against bacterial and viral pathogens. Hence the aim of the work is to study changes in physiology of myeloid cells of peripheral blood and bone marrow of pigs in the process of the acute ASF, to report the characteristics of survival of myeloid cells in the primarily culture of bone marrow and to explain the influence of the major antiviral cytokines on myelopoiesis.

It is shown that in the acute form of ASF, complex changes occur in the neutrophil population and in the populations of early myeloid cells in the peripheral blood, which are normally not present. Severe neutropenia is revealed occurring in the second half of the disease, which occurs due to the mature cells. The main cause of neutropenia is the migration of predominantly mature myeloid cells in the tissues. In acute ASF, compensated proliferation is not reported, but substitution of the mature neutrophil population to young cells is found. However, the decrease of neutrophils in peripheral blood is not fully compensated. In the bone marrow, along with leukopenia, rejuvenation of myeloid populations occurs. Undoubtedly this is the result of appearance of myeloid cells in the blood and is the organism's attempt to restore myeloid populations in blood.

At the peak of the disease (3-4 dpi) the activation of myeloid cells occurs, which is manifested in the increase of their sizes, and the content of RNA in the cytoplasm. These processes are observed in almost all populations of myeloid cells, but more expressed in metamyelocytes and mature neutrophils.

We did not reveal significant changes in populations of myeloid cells *in vitro*. However, the activation and the increase is shown *in vivo* and *in vitro* both in cell size and RNA content in the cytoplasm. At the same time, the size changes of myeloid cells are most likely occur due to the ASFV infection. It is known that the ASF virus is able to affect neutrophils, but only after the infection of main target cells. This coincides with our observation.

Considering the aforesaid, it can be concluded that population changes are not directly virus-induced but are the response of organism on the viremia. The mechanism that starts population changes of all myeloid populations in blood and BM, is associated with a reliable increase of IL-17 and IL-23. In favor of this conclusion is the fact that increased concentrations of these cytokines in the serum precede the neutropenia. Increased synthesis of G-CSF at 3 dpi, occurs after the neutropenia and enhances proliferation of these cells, to compensate their loss.

© National Library of Armenia