

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՄԻՍԱԿՅԱՆ ԱԼԼԱ ԷԴԻԿՅԻ

ԱՐՏԱՈՍԿՐԱԾՈՒԾԱՅԻՆ ԷՐԻԹՐՈՂՈՒՆԵՋԻ ԱԽՏԱԲԱՆԱԿԱՆ ԳՈՐԾԸՆԹԱՅՆԵՐԻ  
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՈԶԵՐԻ ԱՖՐԻԿՅԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ԴԵՊՔՈՒՄ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ ИНСТИТУТ  
МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

МИСАКЯН АЛЛА ЭДИКОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ВНЕКОСТНОМОЗГОВОГО  
ЭРИТРОПОЭЗА ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН - 2016

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

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր Ե.Մ. Կարալովա

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Պ.Ա. Ղազարյան  
կենս. գիտ. թեկնածու Մ.Պ. Լազյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. ապրիլի 15-ին, ժամը 15:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդում (ՀՀ, 0014, Երևան, Հասարթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:  
Սեղմագիրն առաքվել է 2016թ. մարտի 14-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար  
կենս. գիտ. թեկնածու՝



Գ.Մ. Սկրտչյան

---

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

Научный руководитель: доктор биол. наук Каралова Е.М.

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, проф. Казарян П.А.  
кандидат биол. наук Лазян М.П.

Ведущая организация: Российско-Армянский (Славянский) университет

Защита диссертации состоится 15 апреля 2016г. в 15:00 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 14 марта 2016г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,  
кандидат биол. наук



Մկրտչյան Գ.Մ.

## ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

**Աշխատանքի արդիականությունը:** Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտը (ԽԱԺ) խոզերին բնորոշ վիրուսային հիվանդություն է, որի բուժման և կանխարգելման բացակայությունը բերում է կենդանիների զանգվածային մահվան, ինչը լուրջ սոցիալ-տնտեսական խնդիր է ամբողջ աշխարհում: Թեև հիվանդությունը հայտնի է դեռևս 20-րդ դարի սկզբից, սակայն նրա ախտաբանությանը վերաբերվող մի շարք հարցեր, ինչպես օրինակ արյունաստեղծման, մասնավորապես, էրիթրոպոեզի ախտաբանական տեղաշարժերը և նրանց զարգացման մոլեկուլային մեխանիզմները դեռևս ուսումնասիրված չեն:

Հայտնի է, որ որոշ ախտաբանական վիճակներում, մասնավորապես սուր սակավարյունությունների դեպքում խթանվում է արտաոսկրածուծային, այսպես կոչված, «սթրես» էրիթրոպոեզը, որի գլխավոր օրգանն է փայծաղը: ԽԱԺ-ի դեպքում, որին բնորոշ են արյունազեղումները, արյունահոսությունները, սակավարյունությունը, վիրուսի ազդեցությամբ փայծաղի ախտակառուցվածաբանությունը բավականաչափ ուսումնասիրված է, մինչդեռ նրանում արտաոսկրածուծային էրիթրոպոեզի ախտաբանությունը գործնականում գրեթե հետազոտված չէ: Հետաքրքրություն է ներկայացնում նաև ԽԱԺ-ի վիրուսի անմիջական ազդեցությունը ոսկրածուծի էրիթրոիդ բջիջների վրա *ex vivo* պայմաններում առանց օրգանիզմի իմունային համակարգի միջնորդավորված ազդեցության:

**Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները:** Աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել էրիթրոպոեզի ախտաբանական գործընթացները խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի սուր ձևի դեպքում՝ կատարելով փայծաղի, ոսկրածուծի (*in vivo*) և ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի (*in vitro*) էրիթրոիդ բջիջների համեմատական վերլուծություն, ինչպես նաև բացահայտել փոխհատուցող մեխանիզմների դերը կենդանիների կենսունակության և հիվանդության ախտանշանների զարգացման ընթացքում: Այս նպատակի իրականացման համար դրվել էին հետևյալ խնդիրները.

1. Հիվանդության սուր ձևի կլինիկական արտահայտում՝ խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի (գենոտիպ II) միջմկանային ներարկման ճանապարհով:
2. Փայծաղում «սթրես» էրիթրոպոեզի ընթացքում առաջացող էրիթրոիդ բջիջների ձևաբանական ուսումնասիրություն և նրանց համեմատում ոսկրածուծային էրիթրոիդ բջիջների հետ ԽԱԺ-ի սուր ձևի դինամիկայում:
3. Ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոիդ բջիջների ձևաբանական ուսումնասիրություն ինտակտ և ԽԱԺ-ի վիրուսով վարակման պայմաններում:
4. Փայծաղի, ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոբլաստների բջջապակետրոֆոտոմետրիկ և բջջաքիմիական հետազոտություն ԽԱԺ-ի վիրուսով փորձարարական վարակման պայմաններում:
5. Խոզերի արյան և հյուսվածքների կենսաքիմիական հետազոտություն ԽԱԺ-ի ընթացքում երկաթի փոխանակության ուսումնասիրության նպատակով:

**Աշխատանքի գիտական նորույթը:** Առաջին անգամ կատարվել է խոզերի փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների պոպուլյացիոն վերլուծություն, նրանց ձևաբանական ուսումնասիրություն և համեմատում ոսկրածուծային էրիթրոիդ բջիջների հետ առողջ և ԽԱԺ-ի սուր ձևով հիվանդ կենդանիների մոտ հիվանդության դինամիկայում: Խոզերի ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոիդ բջիջների ձևաբանական

ուսումնասիրությունն ինտակտ և ԽԱԾ-ի վիրուսով վարակման պայմաններում: Փայծաղի, ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոբլաստների մակերեսային չափերի, նրանցում ԴՆԹ-ի, ՌՆԹ-ի և սպիտակուցների պարունակության բջջասպեկտրոֆոտոմետրիկ հետազոտությունն ԽԱԾ-ի դինամիկայում: Ինչպես նաև ԽԱԾ-ի ընթացքում երկաթի փոխանակության ուսումնասիրությունն խոզերի արյան և հյուսվածքների կենսաքիմիական հետազոտությունն միջոցով:

**Գիտակիրառական նշանակությունը:** ԽԱԾ-ի դեպքում խոզերի մոտ զարգացող էրիթրոպոեզի ախտաբանական գործընթացների և նրանց առաջացման մեխանիզմների ուսումնասիրությունն ունի ինչպես հիմնարար, այնպես էլ կիրառական նշանակություն, քանի որ ոչ միայն ավելացնում է պատկերացումները վիրուսով պայմանավորված ախտաբանական փոփոխությունների մասին, այլև հնարավորություն է ընձեռնում նոր տեսանկյունից վերլուծելու և մշակելու հիվանդության կանխարգելման, բուժման արդյունավետ մոտեցումներ:

**Ատենախոսության փորձարկումը:** Ատենախոսության հիմնական դրույթները ներկայացվել և զեկուցվել են ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհուրդի նիստում՝ 2015թ. -ի նոյեմբերի 16-ին:

**Հրատարակված գիտական աշխատանքները:** Ատենախոսական աշխատանքի թեմայով հրատարակվել է 5 գիտական հոդված:

**Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը:** Աշխատանքը շարադրված է 124 էջի վրա, պարունակում է 9 աղյուսակ և 32 նկար: Գրականության ցանկը ներառում է հայերեն, անգլերեն ու ռուսերեն լեզուներով 216 անվանում: Ատենախոսությունը բաղկացած է հապավումների ցանկից, ներածությունից, գրական ակնարկից, փորձարարական մասից, հետազոտության արդյունքներից և նրանց քննարկումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից:

## ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

**Կենդանիներ:** Աշխատանքի ընթացքում օգտագործվել են 35-40 կգ քաշով 3-4 ամսեկան Լանդրաս ցեղատեսակի 18 առողջ խոզեր, որոնցից 14-ը միջմկանային ներարկմամբ վարակվել են ԽԱԾ-ի վիրուսով, իսկ 4-ը օգտագործվել ստուգիչ, ինչպես նաև ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի ստացման նպատակով (Lajhta, 1952):

**Վիրուս:** Հետազոտություններում օգտագործվել է ԽԱԾ-ի գենոտիպ II վիրուսը, որի տիտրը որոշվել է հեմադորբցիայի եղանակով (Enjuanes et al., 1976, Wardley and Wilkinson, 1980): Փորձարարական վարակման համար վիրուսի չափաբաժինը կազմել է  $10^4$  հեմադորբցիոն միավոր՝ HADU<sub>50</sub>/մլ 0,2 մլ/կգ-ի հաշվարկով: Ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի վարակի համար BD Falcon™ տեսակի անոթում ցանված ( $10^6$  բջիջ/մլ) ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի բջիջներին տրվել է վիրուս՝  $4 \log_{10}$  HADU<sub>50</sub> /մլ չափաբաժնով:

**Էրիթրոիդ բջիջների ձևաբանական վերլուծություն:** Այս նպատակով ուսումնասիրվել են խոզերի փայծաղի պատճեններն (ներկումն ըստ Գիեմզայի) ու կտրվածքները (ներկումը հեմատոքսիլինով և եոզինով ըստ Վան-Գիզոնի և Ռոմանովսկու (Ромейс, 1954)), ծայրամասային արյան, ոսկրածուծի և ոսկրածուծի չխթանված առաջնային կուլտուրայի ֆիքսված քուրքները և պատճենները (ներկումը

հեմատոքսիլին-եոզինով՝ ըստ Ռոմանովսկու-Գիեմզայի (Ромейс, 1954; Schlam, 2010)): Ուսումնասիրվող բջիջների տոկոսային հարաբերության ստացման համար յուրաքանչյուր դեպքում միջինում դիտարկվել են 300-ից ավելի բջիջներ:

**Բջջասպեկտրոֆոտոմետրիա:** Էրիթրոիդ բջիջներում ԴՆԹ-ի (ներկուսման հիմնային ֆոսֆինով՝ ըստ Ֆլյուգենի), ՌՆԹ-ի (ներկուսման հալոցիանին-քրոմային շիբով՝ ըստ Զանրիդերի մոդիֆիկացված մեթոդի) և սպիտակուցների (ներկուսման նաֆթոլ դեղինիով) որոշման, ինչպես նաև բջիջների մորֆոմետրիկ ցուցանիշների փոփոխությունների հայտնաբերման համար կատարվել է բջջասպեկտրոֆոտոմետրիա՝ կիրառելով SMP 05 (OPTON) մանրադիտակ-ֆոտոմետրը՝ համալրված տեսախցիկով և BioScan ծրագրային փաթեթով:

**Հյուսվածքում երկաթի միացությունների հայտնաբերում:** Խոզերի լյարդի հյուսվածքում երկաթի միացությունների հայտնաբերման նպատակով օգտագործվել է Պերլսի մեթոդը (Rodríguez-Cabezas et al., 2002):

**Արյան, մեզի և արտաթորանքի բիոքիմիական հետազոտությունները** կատարվել են ստանդարտ մեթոդներով:

**Վիճակագրական վերլուծություն:** Արդյունքների վիճակագրական մշակումը կատարվել է վարիացիոն վիճակագրական մեթոդներով՝ օգտագործելով «Տվյալների վերլուծություն» ծրագրի «Նկարագրողական վիճակագրություն» ենթաբաժնի և «Excel» 13.0 տարբերակի վիճակագրական մշակման ծրագրի համադրման փաթեթը:

## **ՇԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄՆԵՐ**

### **Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի կլինիկական և ախտաանատոմիական դրսևորումները ԽԱԾ-ի վիրուսի միջմկանային ներարկման դեպքում:**

Աֆրիկյան ժանտախտի կլինիկական և ախտաանատոմիական դրսևորումները մեր կողմից իրականացված փորձարկումների ժամանակ ԽԱԾ-ի վիրուսի միջմկանային ներարկման դեպքում չէին տարբերվում գրականության մեջ նկարագրվածներից և վարակված խոզերը հասնում էին ազոնալ փուլին վարակման պահից սկսած 6-8-րդ օրերին: Հերձումների ժամանակ փայծաղի մակրոսկոպիկ ուսումնասիրությամբ հայտնաբերվել է օրգանի ծավալի մեծացում (երբեմն մի քանի անգամ), երբեք կորացում, խտաստիճանի՝ փափկեցում: Կակղանը լցված էր արյունով, ուներ մուգ կարմիր երանգ, կտրվածքի վրա հեշտությամբ քերվում էր շիլայանման զանգվածի ձևով (հեմորագիկ սպլենիտ): Ախտահարված օրգանում կային արյունազեղեղման բազմաթիվ օջախներ:

### **Փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների հետազոտությունը ԽԱԾ-ի դեպքում**

Առողջ և ԽԱԾ-ով հիվանդ խոզերի փայծաղի պարենխիմի հիմնական բջիջների պոպուլյացիոն վերլուծությունը հիվանդության դինամիկայում կատարվել է առաջին անգամ: Այն ներկայացվել է սպլենոգրամի ձևով (աղ.1), որտեղ ցույց է տրվել, որ առողջ խոզերի փայծաղի բջիջների մեծ մասը (մոտ 75%) կազմում են լիմֆոիդ բջիջները, իսկ էրիթրոիդ բջիջներին բաժին է ընկնում բջիջների ողջ պոպուլյացիայի մոտ 6%-ը: Սկսած հետվարակային 3-րդ օրվանից (հվօ) լիմֆոիդ պոպուլյացիայի բջիջները նվազում են, իսկ վերջին փուլում նրանց քանակը դառնում է երկու անգամ փոքր համեմատած ստուգիչի (առողջ) հետ: Այն հիմնականում պայմանավորված է հասուն լիմֆոցիտների

նվազմամբ, որոնք նորմայում կազմում են փայծաղի բոլոր կորիզավոր բջիջների 2/3-ից ավելին: Էրիթրոիդ բջիջների քանակը սկսած վարկման 4-րդ օրվանից աստիճանաբար ավելանում է, սկզբում միջինում 25%-ով, իսկ վարակման 5-րդ օրը՝ ավելի քան 2,5 անգամ՝ հիվանդության վերջին փուլում կազմելով փայծաղի բոլոր կորիզավոր բջիջների մոտ 22%-ը: Վարակի ընթացքում տեղի է ունենում նաև նեյտրոֆիլների արժանահավատ ավելացում և ի հայտ են գալիս ատիպիկ լիմֆոցիտներ: Ինչպես երևում է նկար 1-ից, փայծաղում կորիզ պարունակող բջիջների քանակը ԽԱԺ-ի սուր ձևի ընթացքում էականորեն չի փոփոխվում: Հիվանդության ուշ փուլերում մահացող բջիջների քանակն ավելի քան 20 անգամ գերազանցում է ստուգիչ ցուցանիշներին:

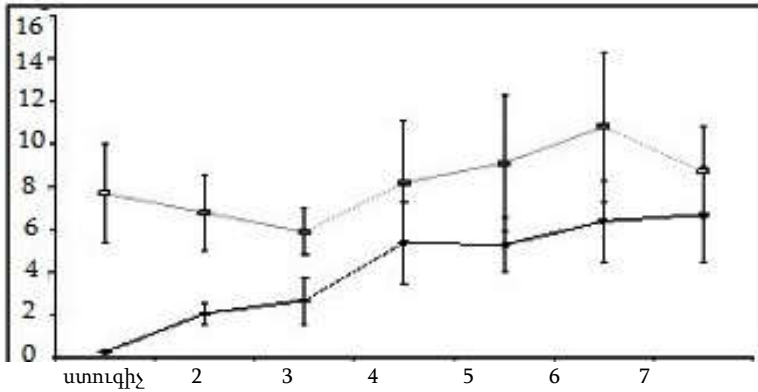
Աղյուսակ 1

Խոզի փայծաղի պարենքիմի հիմնական բջիջների հարաբերակցության ավելնոգրամը ԽԱԺ-ի սուր ձևի դինամիկայում և ստուգիչում (%)

Բջիջների	ստուգիչ	3-րդ հվօ	4-րդ հվօ	5-րդ հվօ	6-րդ հվօ	7-րդ հվօ
մակրոֆագեր	-	-	0.3±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01
լիմֆոցիտներ	68.1±6.7	63.4±7.1	60.4±6.9	33.4±5.1*	35.0±4.9*	28.5±5.5*
ատիպիկ լիմֆոցիտներ	-	0.3±0.01*	0.3±0.01*	2.5±0.5*	1.0±0.2*	3.0±0.7*
լիմֆոբլաստ- ներ	5.5±1.2	1.0±0.3	1.5±0.2	4.9±0.8	3.0±0.9	4.4±1.1
<b>Լիմֆոիդ բջիջներ (ընդհ)</b>	<b>73.6±4.0</b>	<b>64.7±2.5</b>	<b>60.1±2.4</b>	<b>40.8±2.1*</b>	<b>35.0±2.0*</b>	<b>34.5±2.3*</b>
միելոիդ բջիջներ	7.6±0.4	4.3±0.2	4.0±0.3	3.4±0.4	5.0±0.5	4.6±0.7
նեյտրոֆիլ լեյկոցիտներ	8.8±0.4	12.8±0.8	14.1±0.4	15.3±0.7*	17.0±0.6*	26.1±1.4*
հատիկավոր լեյկոցիտներ	4.4±0.3	12.6±0.3	13.9±0.4	14.0±1.4	23.0±1.8	12.1±1.1
<b>Էրիթրոիդ բջիջներ (ընդհ)</b>	<b>5.6±0.9</b>	<b>5.6±1.1</b>	<b>7.6±1.3</b>	<b>16.3±1.8*</b>	<b>19.8±1.9*</b>	<b>22.6±2.7*</b>

\* արժանահավատ է ստուգիչի համեմատությամբ ( $p < 0.05-0.01$ ), մգեցված տառերով տառանձնացված են լիմֆոիդ և էրիթրոիդ բջիջների ընդհանուր քանակները

Փայծաղում էրիթրոիդային պոպուլյացիայի ավելացումը պայմանավորված է առաջին հերթին օքսիֆիլ և պոլիքրոմատոֆիլ էրիթրոբլաստների ավելացմամբ (աղ. 2): Ընդ որում էրիթրոիդային շարքի առավել երիտասարդ ձևեր՝ պրոէրիթրոբլաստներ նորմայում փայծաղում բացակայում են: Վերջիններս ի հայտ են գալիս վարակման 3-4-րդ օրերին և դրանց առկայությունը, ամենայն հավանականությամբ, հանդիսանում է արյունատար հունից գաղթի արդյունք, որտեղ հայտնաբերվում են դեռևս 3-րդ հվօ-ից (աղ. 2): Հարկ է նշել, որ հիվանդության ընթացքում, սկսած հետվարակային 3-րդ օրվանից փայծաղում հայտնաբերվում են նաև ատիպիկ օքսիֆիլ էրիթրոբլաստներ (1%-ից պակաս), որոնք ստուգիչում բացակայում են:



**Նկար 1**-Սպլենոգրամի հիմնական բջջաբանական ցուցանիշները ԽԱԾ-ի սուր ձևի դինամիկայում

*ըստ արսցիսների առանցքի՝* հետվարակային օրերը (հվօ)  
*ըստ օրդինատների առանցքի՝* բջիջների քանակը (%)

- քայքայված բջիջների քանակը 120×85մկմ տեսադաշտում
- կորիզավոր բջիջների քանակը 120×85մկմ տեսադաշտում

Աղյուսակ 2

Փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների բաշխումն ըստ հասունության աստիճանի առողջ և ԽԱԾ-ով հիվանդ խոզերի մոտ (%):

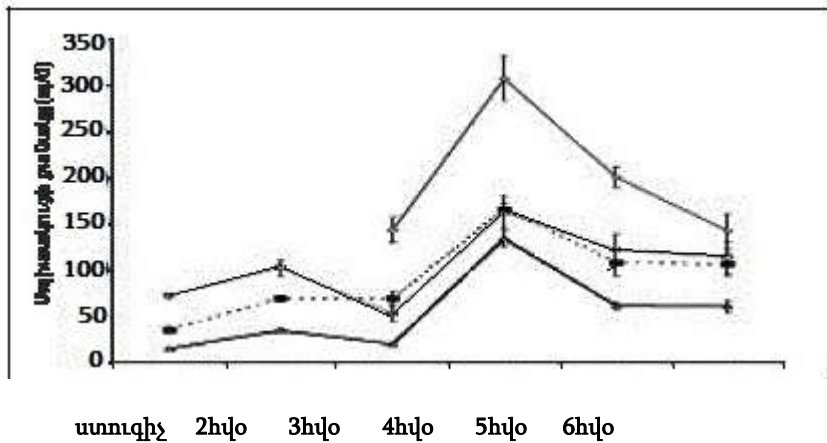
Բջիջներ	ստուգիչ	3-րդ հվօ	4-րդ հվօ	5-րդ հվօ	6-րդ հվօ	7-րդ հվօ
Էրիթրոիդ բջիջներ (ընդհանուր)	5.6±0.9	5.6±1.1	7.6±1.3	16.3±1.8*	19.8±1.9*	22.6±2.7*
պրոէրիթրոբլաստներ	-	-	0.2±0.02	0.2±0.01	0.5±0.02*	1.1±0.3*
բագոֆիլ էրիթրոբլաստներ	2.3±0.9	0.6±0.07	0.6±0.1	1.9±0.3	2.6±0.3	2.4±0.5
պոլիքրոմատոֆիլ էրիթրոբլաստներ	1.1±0.2	1.7±0.4	2.6±0.3	3.9±1.0*	3.7±0.7*	5.0±0.9*
ատիպիկ պոլիքրոմ. էրիթրոբլաստներնր	1.1±0.1	1.0±0.1	1.5±0.1	1.8±0.4	1.9±0.3	1.2±0.1
օքսիֆիլ էրիթրոբլաստներ	1.1±0.08	1.6±0.2	2.0±0.2	8.1±2.1*	7±2.0*	12.6±1.5*
ատիպիկ օքսիֆիլ էրիթրոբլաստներ	-	0.7±0.1*	0.7±0.1*	0.4±0.03	1.4±0.4*	0.3±0.1

\* արժանահավատ է ստուգիչի համեմատությամբ (p<0.05-0.01)

Այսպիսով՝ կարելի է եզրակացնել, որ հիվանդության դինամիկայում նշանակալիորեն ակտիվանում է էրիթրոպոեզը լիմֆոպոեզի ճնշման և կորիզ պարունակող բջիջների մեծ քանակությամբ ոչնչացման ֆոնի վրա, ինչպես նաև հիվանդության վաղ փուլերում ի հայտ են գալիս պրոէրիթրոբլաստներ և էրիթրոիդ բջիջների ոչ մեծ քանակությամբ ախտաբանական ձևեր, որոնք նորմալում բացակայում են փայծաղում:

## Ոսկրածուծային և փայծաղային էրիթրոպոեզների համեմատական բնութագիրը ԽԱԾ-ի սուր ձևի դեպքում

Հայտնի է, որ կայուն էրիթրոպոեզը տեղի է ունենում ոսկրածուծում և նոր էրիթրոցիտները ձևավորվում են անդադար և հաստատուն արագությամբ: Մուր սակավարյունության դեպքում սկսում է գերիշխել արտաոսկրածուծային, այլ կերպ կոչված «սթրես» էրիթրոպոեզը, որի արդյունքում նոր էրիթրոցիտները ձևավորվում են ավելի մեծ արագությամբ (Paulson, 2011; Sokolovsky, 2007): Մույն աշխատանքում կատարվել է ոսկրածուծում ձևավորված էրիթրոիդ բջիջների (Нерсесап, 2015) և ԽԱԾ-ին բնորոշ սակավարյունության հետևանքով փայծաղում խթանված «սթրես» էրիթրոպոեզի արդյունքում ձևավորված էրիթրոիդ բջիջների մակերեսային չափերի (աղ. 3) և նրանցում ՌՆԹ-ի (աղ. 4) պարունակության համեմատական վերլուծություն: Հայտնաբերվել է, որ փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների չափերը և նրանցում ՌՆԹ-ի պարունակությունը ԽԱԾ-ի սուր ձևի ողջ ընթացքում ոչ արժանահավատ կերպով փոքր են, քան ոսկրածուծի համանման բջիջներում: Հետևաբար, թեև ԽԱԾ-ի ընթացքում խթանվում է «սթրես» էրիթրոպոեզը, որի դեպքում կտրուկ արագանում է փայծաղում պահեստավորված էրիթրոիդ բջիջների տարբերակումը, սակայն նրանք մակերեսային ցուցանիշներով և ՌՆԹ-ի պարունակությամբ ոչ արժանահավատ կերպով են տարբերվում ոսկրածուծի կայուն էրիթրոպոեզի համապատասխան բջիջներից: ԽԱԾ-ի ընթացքում փայծաղի էրիթրոիդ բջիջներում սպիտակուցի պարունակությունն ավելանում է (նկ. 2):



**Նկար-2** Փայծաղի էրիթրոիդ բջիջներում սպիտակուցի պարունակության փոփոխությունը ԽԱԾ-ի սուր ձևի դինամիկայում:

- օքսիֆիլ էրիթրոբլաստներ
- ◇- պրոէրիթրոբլաստներ
- բազոֆիլ էրիթրոբլաստներ
- △- պոլիքրոմատոֆիլ էրիթրոբլաստներ



Փայծաղի և ոսկրածուծի էրիթրոիդ բջիջների մակերեսային փոփոխությունների համեմատական  
 ԽԱԾ-ի սուր ձևի

Պրոէրիթրոբլաստ		Մեծ բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Փոքր բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Պոլիքրոմատոֆիլ էրիթրոբլաստ		Փ
Փ	ՈՄ	Փ	ՈՄ	Փ	ՈՄ	Փ	ՈՄ	Փ
-	220.3±12.4	98.3±6.2	122.7±9.2	54.1±3.1	58.4±3.1	45.5±3.2	37.7±0.7	36.6±
-	98.3±8.7	34.5±5.3	59.2±4.3	22.6±1.3	24.9±1.9	20.9±2.4	20.0±0.9	20.1±
-	122.0±6.5	63.8±5.2	63.4±5.9	31.5±2.6	33.5±2.9	24.6±2.1	17.7±0.8	16.5±
-	9.1± 0.9	8.5±1.5	-	-	-	-	-	-
183.6±25.4	228.2±17.5	99.4±9.4	127.1±4.5	54.5±1.5	55.8±4.7	35.3±0.3	35.8±0.8	25.0±
82.0± 5.8	103.4±11.1	37.5±9.6	50.6±7.5	24.7±5.4	24.1.9±2.1	13.9±1.8	18.7±1.1	11.1±
101.5±7.5	124.8±7.5	63.9±6.7	76.5±5.3	29.8±6.7	31.7±5.2	21.4±1.5	17.1±1.1	13.9±
10.1±0.7	6.2±0,6	8.0±1.4	-	-	-	-	-	-
232.4±15.0	177.5±25.1	78.5±5.2	104.6±6.8	46.5±0.9	54.3±1.7	35.6±1.4	36.5±0.9	24.4±
51.3±5.7	75.4±11.1	24.6±4.9	37.1±3.9	12.2±0.2	21.8±1.3	11.1±2.1	17.2±2.2	9.2±
81.1±9.3	102.1±10.5	53.9±3.6	67.5±4.1	34.3±1.1	32.5±5.2	24.5±3.4	19.5±1.7	15.2±
12.2±4.6	8.8±0.5	4.7±0.7	-	-	-	-	-	-
130.8±17.7*	197.5±25.1	71.6±3.8*	113.3±8.2	46.6±1.6	55.3±1.8	34.1±1.6	36.6±1.9	26.4±
150.9±21.2	86.0±11.1	23.2±2.2	45.8±5.1	11.3±1.6	21.7±1.0	10.6±2.2	17.2±2.2	12.1±
80.0±8.3	111.5±19.7	48.4±4.9	67.5±4.1	35.3±1.5	33.6±1.9	23.5±0.8	19.4±1.7	14.3±
8.7±1.0	11.8±0.9	7.7±0.6	-	-	-	-	-	-

\*p<0.1 միտում 4-րդ հիջ համեմատությամբ

Փ-փայծաղում, ՈՄ-ոսկր

կրածուծի էրիթրոիդ բջիջների ՌՆԹ-ի պարունակության փոփոխության դինամիկան ԽԱԾ-ի սուր ձևի

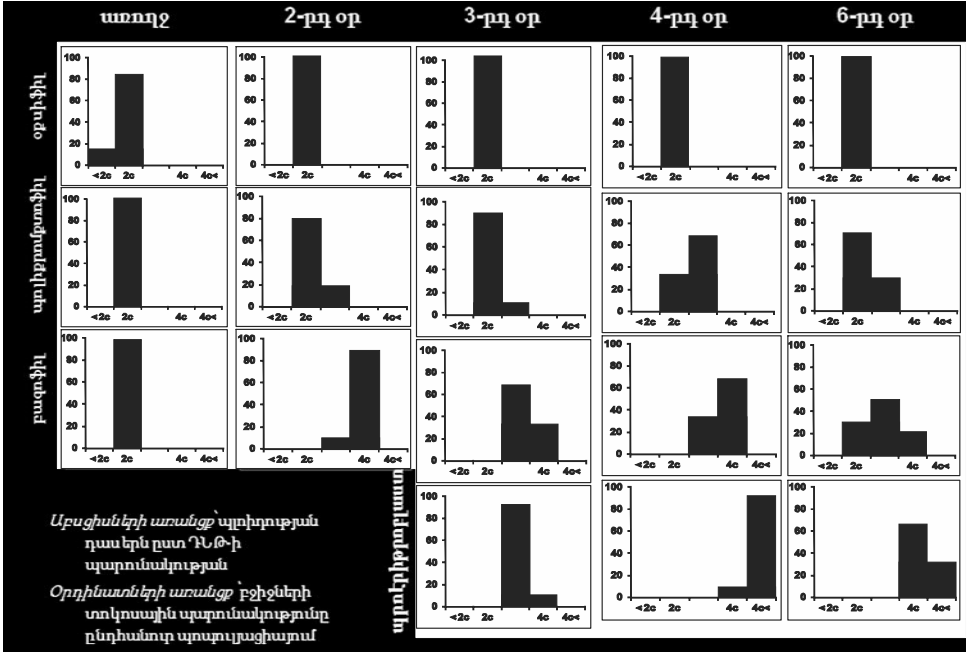
Պրոէրիթրոբլաստ		Մեծ բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Փոքր բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Պոլիքրոմ. էրիթրոբլաստ		Օ
Փ	ՈՄ	Փ	ՈՄ	Փ	ՈՄ	Փ	ՈՄ	Փ
-	257.5	107.7	132.9	54.4	63.8	45.0	49.2	33.2
-	124.4	41.6	59.1	25.3	28.7	20.8	27.6	18.4
-	133.0	66.1	73.8	29.1	35.1	24.2	21.6	14.8
-	10.3	8.3	-	-	-	-	-	-
209.9	236.2	106	111.9	49.0	50.5	36.6	36.0	32.6
121.5	123.4	44.8	45.2	22.2	23.0	18.7	19.4	19.4
88.4	112.8	61.2	68.6	26.8	26.4	17.9	16.6	13.2
9.4	9.4	7.4	-	-	-	-	-	-
259.3*	249.7*	99.2	121.4	50.5	51.6	38.9	35.7	30.7
156.5	132.4	36.2	62.8	17.4	22.4	16.7	20.1	18.5
92.8	117.2	52.9	58.7	43.1	29.2	22.2	15.6	12.2
13.9	5.7	4	-	-	-	-	-	-
146.5*	170.9*	68.3**	98.6	49.0	51.7	34.7***	34.4***	22.7**
62.8*	71.3*	25.2	38.9	21.5	29.6	15.7	19.6	9.1
83.7	99.5	43.1	59.7	27.5	22.1	19.0	14.8	11.6
9.0	7.9	6.6	-	-	-	-	-	-

տ (p<0.05-0.01) բոլոր օրերի համեմատությամբ  
 ստ (p<0.05-0.01) ստուգիչի համեմատությամբ  
 ) ստուգիչի համեմատությամբ

Փ-փայծաղում  
 ՈՄ-ուկրածուծում

**ԴՆԹ-ի պարունակության փոփոխությունները փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների կորիզավոր ձևերում ԽԱԾ-ի սուր ձևի դեպքում:**

Մեր հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ ԽԱԾ-ի ընթացքում տեղի է ունենում էրիթրոիդ բջիջների կորիզների ըստ ԴՆԹ-ի պլոիդության դասերի բաշխման հիստագրամի տեղաշարժ դեպի աջ (սկ.3): Առողջ խոզերի մոտ օքսիֆիլ էրիթրոբլաստները ներկայացված են դիպլոիդ (85%) և հիպոդիպլոիդ (15%) բջիջներով (վերջիններս վկայում են այդ բջիջների կորիզագրկման և վերջնական հասունացման մասին): Հետվարակային 2-րդ օրվանից սկսած անհետանում են հիպոդիպլոիդ բջիջները, տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի պլոիդության ավելացում: Նմանատիպ փոփոխություններ դիտվում են նաև բազոֆիլ, պոլիքրոմատոֆիլ էրիթրոբլաստներում և 3-րդ օրվանից ի հայտ եկած պրոէրիթրոբլաստներում: Դա հնարավորություն է տալիս համարելու, որ վիրուսի ազդեցությամբ տեղի է ունենում պրոլիֆերացիոն գործընթացների արագացում և/կամ բջիջների միտոտիկ ցիկլի արգելափակում G2 փուլում: Այդ գործընթացը սկսվում է դեռևս հիվանդության վաղ փուլերում (2-րդ հվօ) և ավարտվում 4-րդ հվօ: Պրոէրիթրոբլաստների և մյուս վաղ էրիթրոբլաստների պոլիպլոիդացումը կարող է լինել սթրեսի և/կամ ախտաբանության նկատմամբ հարմարվողականության արդյունք:



**Սկար 3** - Փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների կորիզների բաշխումն ըստ ԴՆԹ-ի պլոիդության (c) դասերի

## **Երկաթի փոխանակության խանգարումը և նրա զարգացման մեխանիզմը ԽԱԺ-ի դինամիկայում:**

Բնչպես հայտնի է, վիրուսային հիվանդությունների դեպքում հեմոլիզի պատճառ կարող են լինել հետևյալ գործոնները. ախտաբանական իմունային պատասխանը՝ որպես սուր աուտոիմունային ռեակցիայի տարատեսակ (Hod et al., 2008), վիրուսի ուղղակի կամ միջնորդավորված ազդեցությունը էրիթրոցիտների վրա (Xu et al., 2015), էրիթրոպոեզի նախորդ բջիջների ախտահարումը վիրուսով (Sorngjai et al., 2014) և այլն: ԽԱԺ-ի դեպքում, որն ընթանում է ներանոթային հեմոլիզով (Нерсисян Н.Г., 2015), հետազոտության առաջին պլան է մղվել երկաթի հնարավոր կուտակման ուսումնասիրությունը տարբեր օրգանների հյուսվածքներում, նախ և առաջ յարդում, քանի որ ներանոթային հեմոլիզի դեպքում արյան մեջ մեծանում է լուծված հեմոգլոբինի խտությունը (հեմոգլոբինեմիա), տեղի է ունենում նրա արտազատում մեզի միջոցով, ինչպես նաև քայքայումից առաջացած երկաթ պարունակող գունակների կուտակում բջիջներում: Այսպիսով՝ կիրառելով յարդում երկաթի հայտնաբերման Պերլսի ռեակցիան՝ մեր կողմից ցույց է տրվել, որ հիվանդության վերջնական փուլում (հետվարակային 6-րդ օր) ի տարբերություն սկզբնական փուլի, երկաթի նկատմամբ ռեակցիան խիստ դրական է խոզերի մեծամասնության մոտ: Այսինքն հիվանդության վերջնական փուլում նկատվել են երկաթ պարունակող սպիտակուցների կուտակումներ և՛ բջիջների ցիտոպլազմայում, և՛ միջբջջային նյութում, և՛ երկու տեղակայմամբ էլ:

Հաշվի առնելով իմունային միջնորդանյութերի՝ ցիտոկինների այն դերը, որ ունեն էրիթրոպոեզի խանգարումների զարգացման և ընդհանուր առմամբ արյան համակարգի հոմեոստազի խախտման մեջ՝ մեր աշխատանքի հաջորդ փուլը հանդիսացել է նախաբորբոքային ցիտոկինների (ԻԼ-1 $\beta$ , ԻԼ-6, ԻԼ-8, Ունգ- $\alpha$ ) շիճուկային մակարոնակների հետ երկաթի փոխանակության, հեմատոկրիտի և էրիթրոպոետինի մակարոնակի հիմնական ցուցանիշների հնարավոր փոխկապակցության ուսումնասիրությունը: Տվյալ ցիտոկինների ընտրության պատճառը նրանց ունեցած դերն է արյան ախտաբանության մեջ՝ որպես սակավարյունության զարգացման միջնորդանյութերի (Atkins et al., 1995, Davenport, 1994): Այսպիսով, որպես հիմնական ցուցանիշներ ընտրել ենք նախկինում ուսումնասիրված հեմատոկրիտի, էրիթրոպոետինի (Нерсисян Н.Г., 2015) և մեր կողմից հետազոտված նախաբորբոքային ցիտոկինների շիճուկային մակարոնակների և հյուսվածքներում երկաթի կուտակման (Zakaryan H., Misakyan A. et al., 2015) ցուցանիշները: Մեր կողմից ցույց է տրվել բոլոր նախաբորբոքային ցիտոկինների շիճուկային մակարոնակների, էրիթրոպոետինի և յարդի հյուսվածքում երկաթի կուտակման արտահայտված և արժանահավատ հակադարձ կորելյացիոն կապ հեմատոկրիտի ցուցանիշների հետ (աղ. 5), որը կարող է մեկնաբանվել հոգում արյան ախտաբանության հեմոլիտիկ բնույթի: Ցիտոկինների և հեմատոկրիտի ցուցանիշների արտահայտված հակադարձ կորելյացիան վկայում է սակավարյունության զարգացման մեջ իմունային համակարգի հեմոլիզ առաջացնող գործոնների ներգրավվածության մասին, որն ի հայտ է գալիս հիվանդության վերջին փուլում: Այսպիսով, մեր կողմից հաստատվել են ԽԱԺ-ի սուր ձևի դեպքում էրիթրոպոեզի ախտաբանության հեմոլիտիկ բնույթի մասին տվյալները:

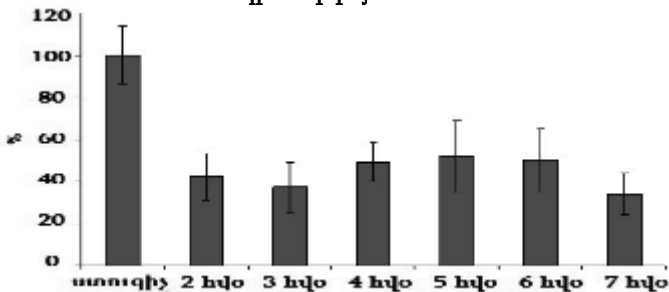
Հեմատոկրիտի, էրիթրոպոետինի, ինտերլեյկինների, ՈւՆԳ- $\alpha$ -ի և էրկաթի հարաբերակցությունը ԽԱԺ-ի դինամիկայում (արժեքները վերցված են Zakaryan H., Misakyan A. et al.,(2015) համահեղինակային աշխատանքից)

	Հեմատոկրիտ	ԻԼ-1 $\beta$	ԻԼ-6	ԻԼ-8	ՈՒՆԳ- $\alpha$	Fe-ը հյուսվածքում	ԷՊՕ
Հեմատոկրիտ	1	-.976**	-.901**	-.906**	-.769*	-.920**	-.952**
ԻԼ-1 $\beta$	-.976**	1	.918**	.832*	.844**	.861**	.921**
ԻԼ-6	-.901**	.918**	1	.739*	.876**	.701	.908**
ԻԼ-8	-.906**	.832*	.739*	1	.698	.871**	.852**
ՈՒՆԳ- $\alpha$	-.769*	.844**	.876**	.698	1	.554	.716*
Fe-ը հյուսվածքում	-.920**	.861**	.701	.871**	.554	1	.826*
ԷՊՕ	-.952**	.921**	.908**	.852**	.716*	.826*	1

\* Կորելյացիան արժանահավատ է 0.05 մակարդակում

\*\* Կորելյացիան արժանահավատ է 0.01 մակարդակում

**Ոսկրածուծի էրիթրոբլաստային կղզյակների ուսումնասիրությունը ԽԱԺ-ի սուր ձևի դինամիկայում:**



**Նկար 4** - Ոսկրածուծի էրիթրոբլաստային կղզյակների քանակությունը ԽԱԺ-ի սուր ձևի դինամիկայում:

*Արցիսների առանցքը* հետվարակային օրերը,  
*օրդինատների առանցքը* կղզյակների քանակությունն արտահայտված %-ով:

Ցույց է տրվել, որ հետվարակային 2-րդ օրվանից սկսած ոսկրածուծի էրիթրոբլաստային կղզյակների քանակությունն արժանահավատ ( $p < 0.05-0.01$ ) կերպով նվազում է ստուգիչի համեմատությամբ (նկ. 4), որը կարող է պայմանավորված լինել վիրուսի ուղղակի և/կամ միջնորդավորված ազդեցությամբ:

**Էրիթրոպոեզը խոզերի ոսկրածուծի առաջնային չխթանված կուլտուրայում:**

Հետազոտությունների ընթացքում առաջին անգամ մեր կողմից կատարվել է խոզերի ոսկրածուծի առաջնային չխթանված կուլտուրայի (ՌԱԿ) Էրիթրոիդ բջիջների ուսումնասիրությունն ԽԱԺ-ի վիրուսով *in vitro* վարակման դինամիկայում կուլտիվացման չորս օրերի ընթացքում: Յույց է տրվել, որ չնայած կուլտուրայում վիրուսի վերարտադրությանը՝ Էրիթրոիդ շարքի բջիջների պոպուլյացիոն ցուցանիշները չեն ենթարկվել նրա ազդեցությանը և բջիջների քանակության ակնհայտ տեղաշարժեր համեմատած ստուգիչի հետ չեն գրանցվել (աղ. 6):

Աղյուսակ 6

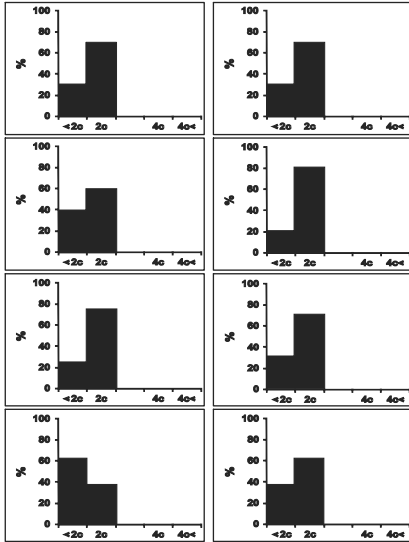
Խոզի ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի բջջային կազմի փոփոխությունը ինտակտ և ԽԱԺ վարակի ընթացքում:

Բջիջներ	Կուլտիվացման ժամկետները							
	24 ժ	24 ժվի	48 ժ	48 ժվի	72 ժ	72 ժվի	96 ժ	96 ժվի
Մոնոցիտ	2.4±0.9	4.4±2.0	2.3±0.4	5.0±3.6	1.5±0.5	6.7±0.7**	1.4±0.3	1.5±0.2
Մոնոբլաստ	5.2 ±1.8	3.6±1.3	5.3±0.9	5.7±3.3	7.7±1.6	7.3±0.2**	4.1±0.8	1.5±0.3
Լիմֆոցիտ	36.8 ±8.8	17.7±5.9	24.6±6.6	19.4±1.1	26.2±4.7	22.0±4.8	28.4±4.9	21.6±5.4
Լիմֆոբլաստ	3.3±1.0	9.0±3.6	3.5±0.9	3.4±4.3	1.5±0.4	2.9±1.2	*/**	2.2±0.3
Միելոիդ բջիջ	2.4±0.5	4.5±0.4	4.7±0.9	9.4±3.4	4.6±1.3	6.4±2.0	9.5±1.4	1.5±0.3**
Նեյտրոֆիլ	3.3±0.8	8.2±4.6	8.2±1.7	11.5±3.2	4.6±1.0	7.4±2.2	12.2±2.7	0.7±0.1**
Էոզինոֆիլ	14.6±2.6	10.0±2.6	16.4±2.2	9.2±1.9	20.0±3.6	10.6±2.3	12.2±3.0	11.9±2.2
Բազոֆիլ	0.1±0.02	0.6±0.2	0.2±0.02	0.8±0.4	0.2±0.03	0.9±0.2	0.1±0.02	0.8±0.1
Պրոէրիթրոբլաստ	5.2±1.8	5.3±1.2	2.1±0.3	4.1±3.8	1.5±0.6	2.6±1.2	1.4±0.4	6.0±2.0
Բազոֆիլ էրիթրոբլաստ	12.2±3.9	22.5±7.7	7.6±2.0	12.6±4.4	10.6±2.4	16.2±1.6	10.7±2.9	29.9±5.4
Պլիթթրոբլ., օբս. էրիթրոբլաստ	14.6±3.2	10.8±7.8	25.2±5.6	15.0±5.1	21.5±4.1	6.3±1.8	20.3±4.6	21.0±6.6
Ատիպիկ լիմֆոցիտ	-	3.4±1.2**	-	3.9±2.2**	-	10.8±0.9**	-	1.5±0.3**

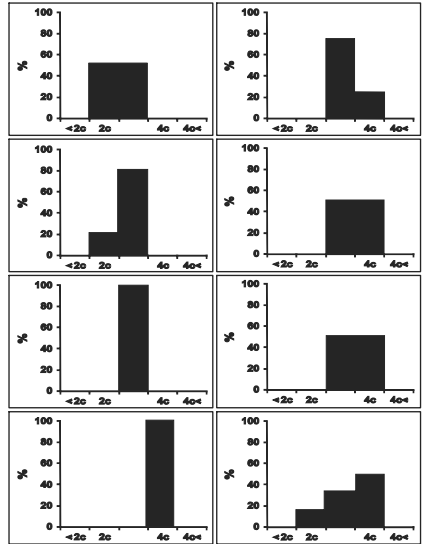
\*կուլտիվացման 4-րդ օրը լիմֆոբլաստների քանակը կտրուկ նվազել է, շատ նմուշներում բացակայել, այդ իսկ պատճառով նրանց հաշվարկ չի կատարվել  
 \*\* արժանահավատ է համապատասխան ստուգիչի համեմատությամբ

Խոզի ՌԱԿ-ի բջիջներում ԴՆԹ-ի միջին պարունակության ուսումնասիրությունը և՛ վիրուսի ազդեցությամբ, և՛ ինտակտ կուլտուրաներում ցույց է տվել հիստոգրամի դեպի աջ տեղաշարժման միտում: Ինտակտ և վարակված կուլտուրաներում ԴՆԹ-ի բացարձակ քանակությունները համեմատելով՝ էական տարբերություններ մեր կողմից չեն գրանցվել: Իսկ Էրիթրոիդ բջիջներում ԴՆԹ-ի ավելացման հավանական պատճառը հանդիսանում է Էրիթրոբլաստային կոլոնիների քայքայումը կուլտուրայի ստացման ընթացքում (նկ. 5):

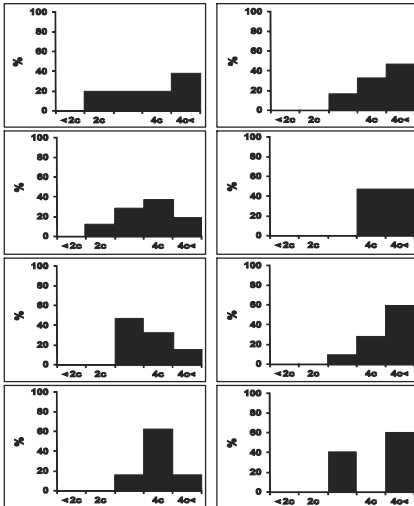
ուշ էրիթորբլաստներ



բազոֆիլ էրիթորբլաստներ



պրոէրիթորբլաստներ



Վերևից ներքև՝ կուլտիվացման  
24, 48, 72 և 96 ժամերը

*Աբսցիսների առանցք՝*  
բջջների պրոլիդությունն  
արտահայտված c միավորով:

*Օրդինատների առանցք՝*  
բջջների հանդիպման  
հաճախությունն՝  
արտահայտված տոկոսով:

**Նկար 5** - Ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի բջջների բաշխումն ըստ ԴՆԹ-ի պրոլիդության ստուգիչում (ձախ պյունակ) և ԽԱՄ-ի վիրուսի ազդեցությամբ (աջ պյունակ)

ՈԱԿ-ի էրիթրոիդ բջիջների և նրանց կորիզների չափերը ստուգիչում և ԽԱԺ-ի վիրուսով վարակված

	Ստուգիչ				ԽԱԺ վարակ		
	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ
ստ	223.3±17.7	292.9±19.4	248.5±20.1	171.5±15.5	339.4±16.8***	229.8±23.1	188.6±2.1
ն	78.4 ±7.1	76.6±6.7	89.8±10.2	64.4±5.9	82.0±6.8	100.7±11.0	109.8±1.1
ր	47.2±3.9	47.4±6.4	51.5±4.4	36.8±2.1	50.2±3.8	45.8±3.7	48.3±1.1
եր	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ
ստ	104.6±10.4	180.9±12.3	93.7±12.1	85.7±5.6	182.5±10.3***	131.4±10.1	98.0±1.1
ն	50.3±8.5	42.3±2.3	41.4±3.4	44.4±3.8	59.3±7.1	39.2±8.0	55.1±1.1
ր	33.3±4.1	29.5±2.5	40.7±4.2	22.8±3.3	33.4±3.8	27.3±1.5	29.0±1.1

Թ-ի պարունակությունը ՈԱԿ-ի բջիջներում (ընդհանուր) և բջջակորիզներում ԽԱԺ-ի վիրուսով վարակված

	Ստուգիչ				ԽԱԺ վարակ		
	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ
ստ	21.6±3.5	26.7±3.7	19.4±2.8	16.8±2.5	27.5±3.9**	20.5±4.5	20.5±1.1
ն	6.0±1.1	6.1±2.1	8.5±2.6	4.9±1.3	5.1±0.8	8.5±1.3	10.9±2.1
ր	3.7±0.3	3.8±0.2	4.1±1.0	3.0±0.5	3.4±0.7	3.1±0.4	3.8±0.7
եր	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ
ստ	8.4±1.1	15.1±2.4	9.9±1.4	6.4±1.0	14.8±1.3**	10.3±1.8	9.3±1.9
ն	2.6±0.6	2.5±0.6	3.1±0.5	2.7±0.7	2.7±0.4	2.2±0.3	3.9±0.4
ր	2.1±0.2	2.4±0.3	2.7±0.5	1.3±0.4	1.7±0.2***	1.3±0.4***	1.8±0.5*

Չափանքանակության պատճառով հաշվարկ չի կատարվել

ժվհ-ժամ վարակից հետո

Վիզուալիզացիայի համեմատությամբ (p<0.5)

Վիզուալիզացիայի համեմատությամբ (p<0.05)



պրոէրիթորբլաստների չափերի մեծացում վարակի վաղ շրջանում:

ՌՆԹ-ի պարունակությունը բոլոր հետազոտված բջիջների ինչպես ցիտոպլազմայում, այնպես էլ կորիզում փոփոխվում է բջիջների չափերի փոփոխություններին համապատասխան: Վիրուսի ազդեցությամբ էական փոփոխություններ տեղի են ունենում վարակման սկզբնական փուլում (24ժ) պրոէրիթորբլաստներում, երբ մեծանում է ՌՆԹ-ի պարունակությունը ինչպես կորիզում, այնպես էլ բջջում (աղ. 8): Աղյուսակ 8-ից հետևում է նաև, որ ԽԱԺ վարակի ընթացքում ՌՆԹ-ի պարունակությունը նվազում է օքսիֆիլ էրիթորբլաստներում ստուգիչ պոպուլյացիայի համեմատությամբ:

Այս երևույթները բացատրել ԽԱԺ-ի վիրուսի վերարտադրությամբ անհնար է, քանի որ այն չի վերարտադրվում ուշ էրիթորբլաստներում, համեմայն դեպս, ոչ վարակի վաղ շրջանում: Մինչդեռ արժանահավատ փոփոխություններ տեղի են ունենում վարակման 48-72-րդ ժամերի ընթացքում: Ամենայն հավանականությամբ այս փոփոխությունները հանդիսանում են ՈԱԿ-ի ոչ էրիթրոիդային բջիջներում ախտաբանական փոփոխությունների արդյունք, որոնք զգայուն են վիրուսի նկատմամբ: Նման բջիջներում (առաջին հերթին մոնոցիտ/մակրոֆագարային շարքի) վիրուսի վերարտադրությունը կարող է հանգեցնել էրիթրոպոեզի ախտաբանության *in vitro* պայմաններում: Իսկ տվյալ բջիջների ախտահարումները հանգեցնում են ուշ էրիթորբլաստների միջնորդավորված ախտաբանական փոփոխությունների, մասնավորապես կորիզագրկման գործընթացներում (Chasis, Mohandas, 2008; McGrath, 2014):

## ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. ԽԱԺ-ի դինամիկայում փայծաղում նշանակալիորեն ակտիվանում է էրիթրոպոեզը, ի հայտ են գալիս ոչ մեծ քանակությամբ պրոէրիթորբլաստներ և էրիթրոիդ բջիջների ախտաբանական ձևեր, որոնք առողջ խոզերի փայծաղում բացակայում են:
2. ԽԱԺ-ի սուր ձևի ընթացքում արագանում է փայծաղում պահեստավորված էրիթրոիդ բջիջների տարբերակումը, սակայն նրանք ՌՆԹ-ի պարունակությամբ և մակերեսային ցուցանիշներով արժանահավատ կերպով չեն տարբերվում ոսկրածուծի կայուն էրիթրոպոեզի բջիջներից:
3. ԽԱԺ-ի սուր ձևի ընթացքում փայծաղի և ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոիդ բջիջներում ԴՆԹ-ի պարունակության վերլուծությունը ուսպահանջ է էրիթրոիդ բջիջների կորիզների ուղիղ ապրիորության ուսպահանջ:

5. *in vitro* վայրմասնավորում ԽՍՏ-ի վիրուսը ամսիջնական ազդեցությունն չի գործում էրիթրոիդ բջիջների վրա:
6. Էրիթրոնի ախտաբանությունը ԽՍՏ-ի սուր ձևի դեպքում կարելի է բաժանել երկու մասի. էրիթրոբլաստոզ, որը դիտվում է հետվարակային առաջին օրերից, և հեմոլիզ, արյունազեղումներ, որոնք ի հայտ են գալիս հետվարակային 4-7-րդ օրերին:
7. Ախտաբանության վաղ դրսևորումները հանդիսանում են էրիթրոբլաստային կղզակների կառուցվածքի և գործառույթի խանգարման հետևանք, որը պայմանավորված է կղզակների կենտրոնական մակրոֆագերի ախտահարմամբ:
8. ԽՍՏ-ի սուր ձևի դեպքում հեմոլիզը հանդիսանում է վիրեմիայի ընթացքում ձեռքբազատվող իմունային միջնորդանյութերի (ցիտոկինների) ազդեցության հետևանք, որոնք հանգեցնում են բնորոշ համընդհանուր համակենսաբանական ախտաբանության:

#### ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՏՊԱԳՐՎԱԾ

##### ԳԻՏԱԿԱՆ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

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.
2. Nersisyan N., Hakobyan A., Simonyan L., Misakyan A., Karalyan Z., Karalova E. Disorders of erythropoiesis during acute African swine fever. // Proceedings of the Yerevan State University. Chemical and Biological Sciences. 2014; 3:46-50.
3. Միսակյան Ա. Փայծաղի ախտահարումը խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի (զենոտիպ II) դեպքում: // Հայաստանի կենսաբանական հանդես: 2014; 3(66):35-38:
4. Мисакян А., Каралова Е. Эритропоэз в селезенке при острой форме африканской чумы свиней. // Вопросы теоретической и клинической медицины. Научно-практический журнал. 2015; 18, 3(99):8-11.
5. Zakaryan H., Cholakyans V., Simonyan L., Misakyan A., Karalova E., Chavushyan A., Karalyan Z. A study of lymphoid organs and serum proinflammatory cytokines in pigs infected with African swine fever virus genotype II. // Arch Virol. 2015; 160(6):1407-

**Ключевые слова** - АЧС, селезенка, первичная культура костного мозга, эритроидные клетки, эритробластоз, гемолиз.

Популяционный анализ основных клеток паренхимы селезенки свиней показал, что в контроле эритроидные клетки составляют около 6.0% от популяции ядерных клеток селезенки, но в динамике африканской чумы свиней (АЧС) их количество меняется: начиная с 4 дня после инфицирования (дпи) число эритроидных клеток постепенно увеличивается, составляя к терминальной стадии болезни около 22% всех ядерных форм селезенки. В 3-4 дпи в селезенке появляются в небольшом количестве проэритробласты и патологические формы эритроидных клеток, которые отсутствуют в селезенке здоровых свиней. Таким образом, при африканской чуме в селезенке значительно стимулируется внекостномозговой эритропоэз. Несмотря на то, что при острой форме АЧС, резко ускоряется дифференцировка резидентных эритроидных клеток селезенки, размерные показатели и содержание РНК в них лишь незначительно отличаются от аналогичных клеток стационарного эритропоэза КМ.

Анализ содержания ДНК в эритроидных клетках селезенки и первичной культуры костного мозга при острой форме АЧС выявил сдвиг гистограмм распределения ядер ранних эритроидных клеток по классам плоидности вправо. Этот процесс начинается на раннем этапе АЧС и заканчивается к 4м суткам инфицирования.

Исследование эритробластических островков костного мозга свиньи в норме и в динамике острой формы АЧС показало, что начиная с 2-ого дпи их количество достоверно ( $p < 0.05-0.01$ ) уменьшается, что может быть обусловлено прямым и/или опосредованным воздействием вируса.

В данной работе нами впервые проводилось исследование эритроидных клеток в условиях *in vitro*, в первичной нестимулированной культуре костного мозга (ПККМ) в течение четырехдневного культивирования в контроле и под действием вируса АЧС (генотипа II). Исследование эритроидной популяции выявило, что несмотря на

об отсутствии прямого воздействия вируса АЧС на эритроидные клетки. Следовательно, можно полагать, что гемолиз при острой форме АЧС является следствием воздействия иммунных механизмов, и в частности медиаторов (цитокинов), выделяющихся при вирусемии. В данном аспекте нами показана, обратная корреляция уровней всех цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ ) и накопления железа в ткани печени с показателями гематокрита, которые могут трактоваться в пользу гемолитического характера патологии крови.

Таким образом, при острой форме АЧС с первых дней инфицирования развивается эритробластоз, а затем гемолиз и кровоизлияния, которые наиболее выражены на 4-7 сутки инфицирования. Для эритробластоза при АЧС характерно очень быстрое проявление уже через 24 часа после в/м инъекции вируса, появляются ранние эритробласты (базофильные), а через 48 часов после в/м инъекции вируса в крови обнаруживаются наиболее ранние идентифицируемые клетки эритроидного ряда – проэритробласты. Механизм появления эритробластоза при острой форме АЧС невозможно связать с гемолизом и потерями эритроцитов при геморрагии. Причина в том, что гемолиз и геморрагии при АЧС вызванной генотипом II, возникают на более поздних стадиях заболевания, приблизительно, к 4 суткам инфекции вируса. Столь раннее возникновение эритробластоза характерно для патологии центрального макрофага эритробластического островка с последующим расстройством функции и структуры эритробластических островков.

Причинами гемолиза при вирусных заболеваниях могут быть следующие факторы: патологический иммунный ответ, как разновидность острой аутоиммунной реакции, прямое или опосредованное действие вируса на эритроциты, поражение вирусом предшественников эритропоэза и др. Прямое действие вируса АЧС на эритроциты может идти двумя путями: непосредственной инфекцией эритроцитов, и /или являться следствием гемадсорбции. Проведенные нами исследования, связанные с непосредственным влиянием вируса АЧС на эритроидные клетки в условиях *in vitro*, показали, что эритроидные клетки оказались невосприимчивы к его действию. Таким образом гемолиз при острой форме АЧС является следствием воздействия иммунных медиаторов, которые приводят к характерной патологии.

**Keywords** - ASF, spleen, primary culture of bone marrow, erythroid cells, erythroblastosis, hemolysis.

Cells population analysis of the pigs spleen parenchyma showed that erythroid cells constitute about 6.0% in all the population of spleen nucleated cells in control, but the dynamics of African swine fever (ASF) its number is changing from the 4<sup>th</sup> day post infection (dpi). the erythroid cells number gradually increases amounting about 22% to end-stage disease in all forms of spleen nuclear cells. At 3-4 dpi the proerythroblasts and pathological forms of erythroid cells appear in a small amount, which are absent in the healthy pigs spleen. Thus, extramedullary erythropoiesis is significantly stimulated in spleen during African swine fever. Despite the fact that in acute form of ASF dramatically accelerates spleen resident erythroid cells differentiation, dimensional indicators and RNA content in which only insignificantly different from bone marrow cells formed during stationary erythropoiesis.

Analysis of the DNA content of spleen and primary culture of bone marrow erythroid cells during acute form of ASF has revealed a shift of early erythroid cells nuclei ploidy classes distribution histogram to right. This process begins early and ends to the 4th day of ASF infection.

Research porcine's bone marrow erythroblastic islands in control and dynamics of the acute form of ASF found that starting from the 2<sup>nd</sup> dpi their number was significantly ( $p < 0.05-0.01$ ) decreased, which may be due to the direct and/or indirect exposure with virus.

In this work, we first carried out a study of erythroid cells *in vitro* conditions, that is unstimulated primary culture of bone marrow (PCBM) during four days in control and influence by ASF virus (genotype II). Erythroid population analysis found, that in spite ASF virus replication in pigs PCBM, erythroid cells population figures do not differ from the control, but because the lymphoid cells downsizing their relative abundance increased. The content of DNA and RNA in PCBM erythroid cells show no significant differences in both intact and in infected. All this indicate a lack of direct influence of erythroid cells with ASF virus. Therefore,

Thus, in the acute form ASF from the first days of infection develops erythroblastosis then hemolysis and hemorrhage, which are most pronounced on 4<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> day post infection. Erythroblastosis in ASF is characterized by a very rapid onset. Within 24 hours after the i/m injection of the virus appear early erythroblasts (basophilic), and after the 48 hours i/m injection of the virus found in the blood the earliest identifiable erythroid cells - proerythroblasts. The mechanism of occurrence of erythroblastosis in the acute form of ASF can not be associated with hemolysis and loss of red blood cells during hemorrhage. The reason is that hemolysis and hemorrhage caused with ASF virus genotype II occur in the later stages of the disease, approximately 4<sup>th</sup> days post infection. This early appearance of erythroblastosis is characteristic of the pathology erythroblastic island's central macrophage followed by disorder function and structure erythroblastic islands.

The causes of hemolysis in viral diseases may be following items factors: the pathological immune response, as a type of acute autoimmune response, direct or indirect effect of the virus on the red blood cells, defeat the virus precursors of erythropoiesis, and others. The direct effect of ASF virus in the red blood cells can go two ways: direct infection of red blood cells, and/or be a consequence of haemadsorption. Our studies related to the direct impact of ASF virus in the erythroid cells *in vitro*, showed that the erythroid cells proved to be immune to its effects. Thus hemolysis in the acute form of ASF is a consequence of exposure immune mediators that lead to the characteristic pathology.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'E. A. S. B.', located in the bottom right corner of the page.