

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ ՆԱՐԵԿ ՀՐԱԶՅԱՅԻ

ԷՐԻԹՐՈՊՈՆԵԶԻ ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԸ ՍՈՒՐ ԱՖՐԻԿԱԿԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

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

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2015

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

НЕРСИСЯН НАРЕК ГРАЧЬЯЕВИЧ

НАРУШЕНИЯ ЭРИТРОПОЭЗА ПРИ ОСТРОЙ ФОРМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.03 - «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН-2015

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

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր Զ.Ա. Կարալյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Պ.Ա. Ղազարյան  
կենս. գիտ. թեկնածու Է.Ա. Առաքելովա

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2015թ. ապրիլի 17-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդում (0014, Երևան, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2015թ. մարտի 17-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 З.А. Каралян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, проф. П.А. Казарян  
кандидат биол. наук Э.А. Аракелова

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 17 апреля 2015г. в 14<sup>00</sup> 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 17 марта 2015г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,  
кандидат биол. наук



Г.М. Мкртчян

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Африканская чума свиней (АЧС) является высоконтагиозным инфекционным заболеванием, ведущими симптомами которого являются лихорадка, множественные геморрагии, воспалительные, и некротические изменения в различных органах.

АЧС является одним из серьезнейших трансграничных заболеваний, которое Всемирной организацией по охране здоровья животных было включено в "Перечень заболеваний А", определяемых как инфекционные заболевания с высокой летальностью. Болезнь стремительно распространяется независимо от государственных границ. Из-за отсутствия лечения и профилактики АЧС приводит к тяжелым социально-экономическим последствиям (Sánchez-Vizcaino, et al, 2009).

Несмотря на то, что АЧС как самостоятельная нозологическая единица с вирусной этиологией введена Р. Монтгомери еще в 1921 г (Сох, 1963), ряд аспектов патологии данной болезни остаются не исследованными. Мы рассматриваем острую форму АЧС, которая длится 4-7 суток со 100%-ным фатальным исходом;

При острой форме АЧС в крови больных свиней определяются лимфопения, нейтрофилия (DeTray, Scott, 1957, Karalyan et al, 2012) и нарушения в эритропоэзе (Rodriguez, 1972, цитируется по Gomez-Villamandos, 1997). Нарушения эритропоэза является одной из наименее изученных патологий домашних млекопитающих, и, в частности, практически не исследована патология эритропоэза при различных формах АЧС. До начала наших исследований в литературе имелись две статьи, посвященные этой патологии.

Так, исследование костного мозга при АЧС выявило стимуляцию эритропоэза (Gomez-Villamandos et al, 1997, Rodriguez 1972), среди причин которой, согласно Gomez-Villamandos et al (1997), указывается активация клеток моноцитарно-макрофагального ряда вследствие возрастания активности цитокин опосредованного эритропоэза.

Все вышесказанное послужило основой для проведения данной работы.

**Цель работы:** Исследование физиологических изменений эритроидных клеток периферической крови и костного мозга, основные пути нарушения эритропоэза в динамике острой формы африканской чумы свиней и роль компенсаторных механизмов в развитии симптоматики заболевания.

Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Исследование морфологически распознаваемых эритроидных клеток периферической крови и костного мозга здоровых свиней.
2. Исследование эритроцитов и эритробластов периферической крови и костного мозга, экспериментально зараженных вирусом африканской чумы свиней (АЧС)

Для этого в периферической крови и костном мозге:

а) *На популяционном уровне:*

- Был проведен морфологический анализ эритроцитов и эритробластов в контроле и на всех стадиях заболевания.

б) *На клеточном уровне:*

- Была исследована динамика изменений площади цитоплазмы, ядра и ядрышек эритробластов в контроле и на всех стадиях заболевания.

в) *На субклеточном уровне:*

- Проведен количественный анализ содержания гемоглобина в эритроцитах периферической крови больных АЧС свиней.
- Была исследована динамика содержания РНК в цитоплазме, ядрышках и суммарных нуклеиновых кислот в ядрах ранних эритроидных клеток.
- Определено среднее содержание ДНК в ядрах эритроидных клеток и построены гистограммы распределения ДНК по классам ploidyности.

В сыворотке крови здоровых и больных животных была изучена:

1. динамика выброса основного сывороточного стимулятора эритропоэза-эритропоэтина при АЧС.
2. Проведен биохимический анализ крови, мочи и кала здоровых и больных АЧС свиней.

**Научная новизна работы.** В периферической крови больных АЧС свиней были выявлены три вида эритроцитов, достоверно различающиеся по размерам и по насыщенности гемоглобином. Выявлены изменения в популяционном составе эритроидных клеток периферической крови и костного мозга свиней на всем протяжении заболевания. Впервые проведено цитоморфометрическое исследование эритроцитов и эритробластов и определена динамика изменений размеров ядер, ядрышка и цитоплазмы эритроидных клеток в контроле и на всех стадиях АЧС. Исследованы изменения цитоспектрофотометрических показателей нуклеиновых кислот и содержания ДНК в эритроидных клетках периферической крови и костного мозга в динамике заболевания, а так же содержание эритропоэтина в сыворотке периферической крови здоровых и больных острой формой АЧС свиней на всех стадиях болезни.

**Практическая значимость работы.** Полученные данные существенно расширили и углубили представления о механизмах регуляции эритропоэза при АЧС и роли в их деятельности эндогенного фактора. Удалось установить, что при этом включаются механизмы регуляции эритропоэза, деятельность которых приводит к кардинальным перестройкам в кроветворении. Изучение различных аспектов патологии эритропоэза позволит выработать новые патогенетические подходы в лечении данного заболевания. На сегодняшний день именно использование невакцинальных медикаментозных методов для профилактики и/или лечения АЧС и, возможно, некоторых других вирусных заболеваний, является одним из наиболее перспективных направлений в ветеринарной практике

**Публикации.** Основные результаты настоящего исследования отражены в 6-и публикациях.

**Апробация работы.** Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии РАН РА (2011-2014).

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 22 таблиц и 15 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов. Список цитируемой литературы содержит 165 источников.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальной модели использовались 24 свиньи в возрасте от 3 до 4 месяцев весом 35-40 кг. 20 свиней заражали подкожным введением вируса АЧС, а 4 свиньи использовали в качестве контроля. Этаназия свиней проводилась согласно протоколу Guide for the Care and Use of laboratory Animals, AVMA Guidelines (Institutional Review Board/ Independent Ethics Committee of the Institute of Molecular Biology of NAS, IRB00004079). Работу проводили на мазках клеток периферической крови и отпечатках костного мозга. Периферическая кровь для приготовления мазков бралась из глазного венозного синуса (Stier, Leucht, 1980) ежедневно в одно и то же время у свиней, предварительно на сутки раньше зараженных вирусом африканской чумы. Отпечатки костного мозга этих же свиней делали на 2 день после инфицирования (дп), 3дп, 4дп, 5дп, 6дп и 7дп. Аналогичным образом делали мазки и отпечатки здоровых свиней. Все мазки и отпечатки фиксировали в 96% этиловом спирте в течение 30 мин.

**Вирус.** В работе использовали вирус АЧС генотип II. Титрация и определение дозы вируса осуществлялись рутинным методом гемадсорбирующих единиц, согласно

Enjuanes et al, (1977). Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях, определялась в лаборатории до начала эксперимента и составляла  $10^4$  гемадсорбирующих единиц – ГАЕ  
50/мл.

**Морфологический анализ клеток.** Популяционный анализ эритроидных клеток периферической крови и костного мозга здоровых и зараженных АЧ свиней проводили на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином по Романовскому-Гимза (Ромейс, 1954).

В последнее время появилось несколько различных классификаций эритроидных клеток. В наших исследованиях мы используем классическую терминологию, однако для удобства восприятия приводим более современную классификацию (Schlamm, 2006).

**Окраска ДНК по Фельгену и цитофотометрия ДНК.** Для цитохимических исследований все препараты одновременно окрашивали реактивом Шиффа по Фельгену. Гидролиз ДНК проводили в 5Н НС1 в течение 1 часа при  $t = 22^{\circ}\text{C}$  (Магажян, Каралова, 1989). Количественное определение комплекса ДНК-фуксин, площади ядер и ядрышек всех исследуемых форм эритроидных клеток на мазках периферической крови и отпечатках костного мозга в контроле и при воздействии вируса АЧС производили при длине волны 575 нм на телевизионном анализаторе изображений. В каждом случае производили измерения в 100 ядрах. На основании полученного материала по содержанию ДНК в ядрах строились гистограммы их распределения по классам ploidy. Для их построения определяли количество ДНК в ядрах лимфоцитов периферической крови здоровых свиней, которое строго соответствует содержанию ДНК в диплоидной популяции в фазах  $G_0/G_1$  клеточного цикла.

**Окраска РНК галлоцианин-хромовыми квасцами.** Для окраски галлоцианин-хромовыми квасцами (ГХК) использовали галлоцианин фирмы (Aldrich). Все фиксированные в 96% спирте препараты одновременно окрашивались в течение 48 часов в растворе, приготовленном на основе ГХК (Sandritter et al, 1966). Для количественного анализа содержания РНК и размеров ядрышка, ядер, цитоплазмы и клеток использовалась стандартная программа открытого доступа ImageJ, которая позволяет исследовать в одной и той же клетке площадь цитоплазмы, ядра и суммарно ядрышек, а также содержание в них РНК. Все размеры клеток даны в  $\text{мм}^2$ , а содержание РНК в условных единицах.

**Окраска белка нафтоловым желтым.** Для вычисления общего белка в эритроидных клетках, все препараты были обработаны окраской нафтоловым желтым. Техника окраски проводилась рутинным методом, согласно Gaub et al, (1975).

## Биохимическое исследование крови, мочи и кала

### 1. Гематологические исследования крови

Нами был определен средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина Hb (MCH), средний объем гемоглобина (Hb) и гематокрит (HCT). Эта часть исследований проводилась с использованием автоматического счетчика клеток крови Sysmex XS 1000i.

**Биохимический анализ сыворотки крови.** Химический анализ сыворотки крови был сделан на 400 анализаторе COBAS Integra 400. Аутентичные реагенты (Roche) использовали в определении всех показателей крови. Ферментативные аномалии были оценены путем измерения гамма-глутамилтрансферазы (GGT), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ)

**Определение концентрации эритропоэтина в плазме крови.** Уровни ЭПО в образцах плазмы измеряли с помощью стандартного метода твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (набор для определения свиного ЭПО: MyBioSource; ELISA Kit; MBS269716).

### 2. Анализ мочи

Проводился стандартными рутинными методами.

### 3. Анализ кала на скрытую кровь

При определении кала на скрытую кровь использовался FOBТ комплект (Hemoccult II, Beckman). Все фекальные образцы от всех экспериментальных животных в динамике заболевания собирались сразу после дефекации.

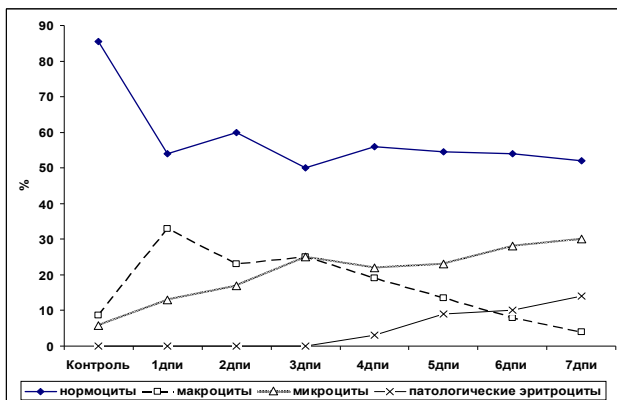
**Статистическая обработка.** Все полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки “Excel” версия 17.0. Достоверность различий между средними значениями определяли по критерию t Student. При непараметрическом распределении признаков использовали u-критерий Вилкоксона Манн-Уитни по программе SPSS 17.0 (SPSS, INC., Chicago, IL).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

### ПАТОГЕНЕЗ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ АЧС

#### Динамика изменений числа, размеров и содержания гемоглобина в эритроцитах при острой форме АЧС

Исследование мазков периферической крови здоровых свиней показало, что эритроидная клеточная популяция состоит, в основном, из зрелых нормоцитемических эритроцитов (80-90%). Их площадь в среднем составляет 35,4 мкм<sup>2</sup>: около 10% приходится на макроциты, площадь которых достигает 43,2 мкм<sup>2</sup> и более 8% составляют микроциты, площадь которых не превышает 28.0 мкм<sup>2</sup>. Между средними площадями всех видов эритроцитов периферической крови свиней различия достоверны (p<0.001). АЧС с первых дней болезни вызывает серьезные изменения в соотношении разных форм эритроцитов: так число нормоцитов падает на 37%, число макроцитов увеличивается в 3.8 раза, а микроцитов в 2.2 раза (рис. 1).



**Рис.1.** Динамика изменений соотношения различных видов эритроцитов крови здоровых и больных АЧС свиней.

Важно отметить, что, начиная с 4-х суток болезни, в крови появляются клетки, площадь которых достоверно ниже, чем площадь микроцитов, как контрольной, так и опытной групп (табл.1).

Однако, содержание гемоглобина в этих клетках достоверно выше, чем в микроцитах (p<0,001) и соответствует среднему содержанию гемоглобина в популяции эритроцитов. Вначале их число не превышает 3%, однако, постепенно увеличиваясь, к терминальной стадии достигает 14% от общего числа популяции эритроцитов.

Таблица 1

Динамика изменений площади различных видов эритроцитов крови здоровых и больных АЧ свиней.

Сутки	Типы эритроцитов				Среднее по всем типам эритроцитов
	Нормоциты	макроциты	микроциты	патологические эритроциты	
Контроль	35,2±0,6	43,2±1,8	27,8±1,8	-	35,4±0,6
1	39,0±0,6	51,0±0,9	31,7±1,2	-	42,1±0,8
2	37,9±0,6	53,3±1,0	29,9±1,7	-	40,7±0,9
3	39,1±1,0	54,5±1,1	29,8±2,7	-	45,5±1,0
4	31,7±0,6	37,7±1,8	22,2±0,7	16,7±1,7 *	30,5±0,9
5	39,2±0,9	56,2±1,3	30,5±1,3	12,8±2,8*	45,8±0,9
6	27,7±0,9**	36,6±2,6	17,9±1,3**	13,1±1,2*	28,0±1,0**
7	29,7±0,7**	40,4±3,3	22,4±0,8	20,9±0,9*	28,4±0,7**

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

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

Надо заметить, что количество гемоглобина и размеры нормоцитов, макроцитов и микроцитов достоверно отличаются как друг от друга, так и от контроля.

Таблица 2

Содержание гемоглобина в эритроцитах крови здоровых и больных АЧ свиней (в у.е.)

Сутки	Типы эритроцитов				Среднее по всем типам эритроцитов
	нормоциты	макроциты	микроциты	патологические эритроциты	
контроль	14,6 ±0,2	18,5±0,4	11,1±0,3	-	14,7±2,0
1	14,6±0,3	17,8±0,5	12,1±0,7	-	15,4±0,3
2	14,9±0,2	18,2±0,5	11,0±0,4	-	15,3±0,3
3	14,3±2,0	18,3±0,2	11,3±0,3	-	16,1±0,3
4	15,5±0,2	19,4±0,4	11,8±0,2	20,0±1,5*	16,0±0,3
5	14,8±0,2	18,0±2,3	11,3±0,2	15,9±0,4*	15,9±2,9
6	15,6±0,3	19,2±0,3	10,5±0,5	13,1±1,2*	15,5±0,3
7	15,2±0,2	20,0±1,0	10,7±0,3	14,6±1,0*	14,8±0,3

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

### Динамика изменений популяционного состава и площади ядерных форм эритроидных клеток крови в контроле и при АЧС

Известно, что в периферической крови млекопитающих, в том числе и у свиней, в норме практически не встречаются ядерные формы эритроидных клеток. Однако у свиней, больных АЧ, уже на 1дпи нами были обнаружены эритробласты, количество которых составляло около 8% среди всех основных клеток периферической крови больных свиней. Ко 2дпи их количество увеличилось на 62%, а затем постепенно, но недостоверно снижаясь, к терминальной стадии заболевания оказалось на 25% ниже по сравнению с 1дпи. Начиная со 2дпи, их число значительно возрастает, и впервые появляются наиболее ранние морфологически распознаваемые эритроидные клетки – проэритробласты,

количество которых на 2дпи не превышает 1%, а затем, постепенно возрастая, на 3 и 4дпи достигает 1.5% от всей популяции ядерных эритроидных клеток. В дальнейшем, по мере нарастания тяжести заболевания, в крови постепенно, но недостоверно, уменьшается число проэритробластов, и к терминальной стадии оно не превышает 6.0% от всех ядерных форм эритроидных клеток. (табл. 3).

Цитоморфометрические исследования площади клеточных структур всех ядерных форм эритроидных клеток периферической крови при воздействии вируса АЧС, приведенные в таблицах 6, 7 и 8, показали, что площадь как клеток в целом, так и цитоплазмы, ядра и ядрышек проэритробластов на всем протяжении болезни достоверно увеличивается ( $p < 0.001$ ). В отличие от проэритробластов площадь больших эритробластов при этом, вплоть до последней стадии заболевания, сохраняет только тенденцию к увеличению и лишь на терминальной стадии достоверно увеличивается по сравнению с 1дпи.

В отличие от ранних форм эритроидных клеток площадь более дифференцированных мелких эритробластов и их ядер в процессе болезни недостоверно уменьшается, в то время как площадь полихроматофильных эритробластов и их ядер на всем протяжении болезни уменьшается достоверно.

Таблица 3

Распределение ядерных форм эритроидных клеток по степени зрелости в й крови свиней при острой форме АЧ (%)

Типы клеток	Конт.	1дпи	2дпи	3дпи	4дпи	5дпи	6дпи	7дпи
Эритробл.	-	8.0±0.9*	13.0±0.7*	12.5±1.3*	11.9±1.6*	10.9±1.4*	9.5±2.0*	6.1±1.0*
Проэритр.	-	0	7.6±1.4*	12.0±3.6*	12.5±1.1*	11.0±1.2*	12.6±3.3*	4.9±0.6*
ББЭ	-	22.5±2.2*	16.2±2.4*	13.6±2.3*	13.5±1.2*	24.8±4.4*	39.0±4.7*	37.7±4.3*
МБЭ	-	41.3±4.5*	26.7±4.3*	26.4±2.4*	34.5±3.4*	33.0±3.8*	37.9±4.6*	47.3±4.3*
Поли Э	0-2	13.7±1.2	23.6±4.1*	20.8±2.8*	16.0±5.6*	21.1±4.8*	7.4±2.3	9.6±4.5
Орто Э	0-2	22.5±3.4*	26.1±4.7*	27.2±4.8*	23.5±3.4*	10.1±2.2*	2.2±0.6	0

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

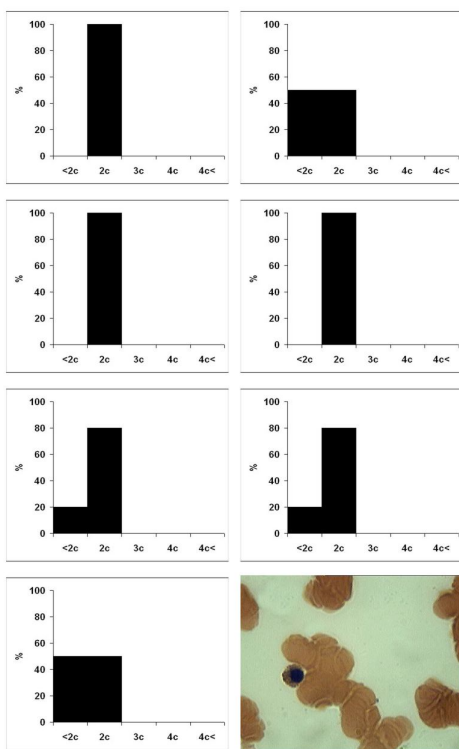
Аналогичная тенденция наблюдается и при определении площади цитоплазмы и ядра оксифильных эритробластов, но на терминальной стадии болезни, в отличие от других ядерных форм эритроидных клеток, оксифильные эритробласты полностью исчезают. Площадь базофильных эритробластов периферической крови при АЧС существенно не меняется на протяжении всего заболевания, а площадь поздних эритробластов периферической крови свиней при этом уменьшается на протяжении заболевания, начиная с 2-3 дпи. Надо заметить, что уменьшение клеток идет за счет уменьшения площади ядер, так как площади цитоплазмы всех исследованных клеток меняется недостоверно.

### **Динамика изменений содержания ДНК и РНК в ядрах эритробластов крови при острой форме АЧС**

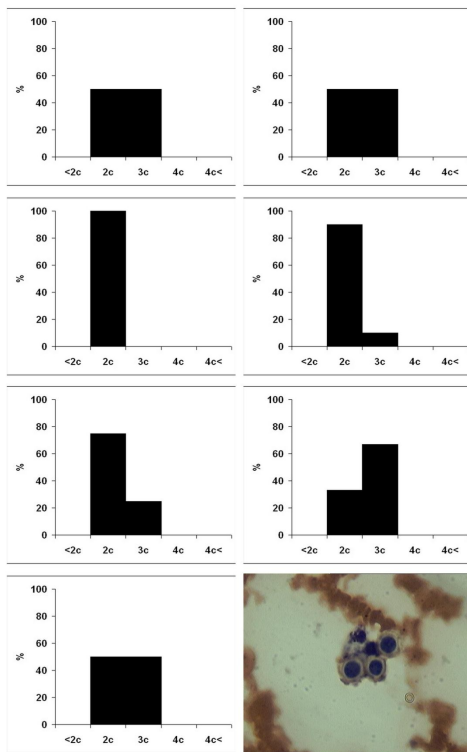
На начальном этапе заболевания в крови, в основном появляются, поздние формы эритробластов, в том числе ортохромные, полихроматофильные и базофильные эритробласты костного мозга, которые выбрасываются в периферическую кровь с первого дня болезни, не завершив дифференцировку и не превратившись в эритроциты. Как



следует из рисунка 2, оксифильные эритроциты в периферической крови свиней на начальной стадии АЧС в целом диплоидны. Однако, начиная с 3дпи, появляются гиподиплоидные ортохромные эритроциты, процент которых, постепенно увеличиваясь, к 7 дпи достигает 50% от всей популяции оксифильных эритроцитов. В отличие от оксифильных, полихроматофильные эритроциты периферической крови на начальном этапе заболевания представлены диплоидными и гипердиплоидными клетками (рис.3). Но уже с 3 дпи, и до 5 дпи включительно, основную массу полихроматофильных эритроцитов составляют диплоидные клетки, а на терминальной стадии болезни (6 дпи и 7дпи) вновь значимой и/или преобладающей становится гипердиплоидная популяция. Можно полагать, что в динамике острой АЧС происходит выброс из костного мозга полихроматофильных эритроцитов, не закончивших своей дифференцировки.



**Рис. 2.** Распределение ядер оксифильных эритроцитов крови свиней по классам ploidy в динамике острой формы АЧС 1 -7- дни после инфекции

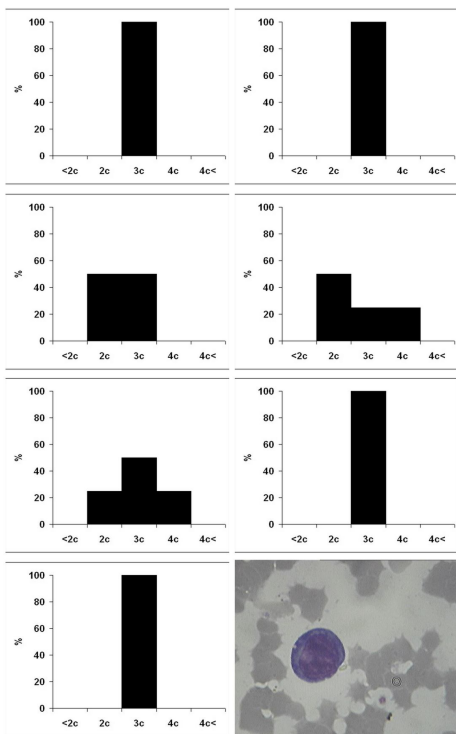


**Рис. 3.** Распределение ядер полихроматофильных эритроцитов крови свиней по классам ploidy в динамике острой формы АЧС. 1 -7- дни после инфекции

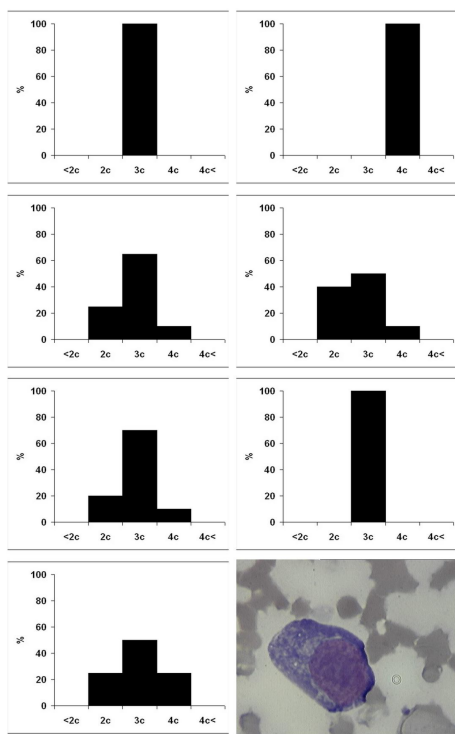
*По оси абсцисс – единицы ploidy, по оси ординат – частота встречаемости.*

Необходимо отметить, что снижение содержания ДНК в оксифильных эритроблестах совпадает со снижением содержания ДНК в полихроматофильных эритроблестах.

На рисунке 4 представлены суммарно все базофильные эритроблесты периферической крови с первого дня заболевания. Как следует из рисунка, базофильные эритроблесты на ранних стадиях заболевания (1-2 дни) представлены преимущественно гипердиплоидными клетками. Затем появляются диплоидные эритроблесты, составляющие на 3-5 сутки болезни около половины всех клеток базофильной популяции эритроблестов крови. А на заключительной стадии заболевания (6-7-е дни) вновь преобладающей становится гипердиплоидная популяция базофильных эритроблестов.



**Рис. 4.** Распределение ядер базофильных эритроблестов крови свиней по классам пloidности в динамике острой формы АЧ 1-7 дни после инфекции



**Рис. 5.** Распределение ядер проэритроблестов крови свиней по классам пloidности в динамике острой формы АЧ 2-7 дни после инфекции

*По оси абсцисс – единицы пloidности, по оси ординат – частота встречаемости.*

Из этого следует, что в данном случае имеет место ускорение дифференцировки клеток эритроидной популяции и их выброс в периферическую кровь, а также, возможно, нарушение функции эритробластических островков костного мозга, в результате чего в

костном мозге, а затем и в периферической крови, появляются не закончившие дифференцировку гипердиплоидные эритробласты. Нами также было проведено исследование содержания РНК во всех эритроидных клетках периферической крови свиней с 1дпи по 7дпи АЧС.

Как видно из таблиц 4-6, содержание РНК в проэритробластах периферической крови свиней на всем протяжении болезни вплоть до терминальной стадии, достоверно увеличивается ( $p < 0.01$ ) как в клетках в целом, так и в цитоплазме, ядре и в ядрышках. Такая же тенденция сохраняется и во всех структурах популяции больших базофильных эритробластов, но различия в содержании РНК как в самих клетках, так и в их цитоплазме и в ядре недостоверны.

**Таблица 4**  
Динамика изменений содержания РНК в проэритробластах крови при АЧС (у.е.)

Сутки	Клетка	Цитоплазма	Ядро	Ядрышко
2	77.9±14.0	24.3±7.2	53.6±6.7	2.4±0.2
3	149.1±19.1*	58.1±7.5*	91.0±9.7*	7.9±1.3*
4	163.5±18.9*	71.4±19.2*	93.1±7.2*	7.3±0.3*
5	186.5±14.5*	70.7±6.2*	115.8±11.7*	8.6±2.7*
6	199.2±17.4*	87.3±13.3*	111.9±6.2*	8.0±0.7*
7	220.3±17.3*	102.0±10.2*	118.3±8.2*	8.0±0.5*

\* достоверно выше по сравнению со 2 дпи ( $p < 0.05$ - $p < 0.005$ )

**Таблица 5**  
Динамика изменений содержания РНК в больших и малых базофильных эритробластах крови при АЧС (у.е)

Сутки	Большие базофильные эритробласты			Малые базофильные эритробласты		
	Клетка	Цитоплазма	Ядро	Клетка	Цитоплазма	Ядро
1	83.8±7.3	23.6±2.7	60.2±6.1	50.2±1.6	12.9±0.1	37.3±1.5
2	68.6±1.6	21.2±0.4	47.4±2.1	36.7±2.1*	10.3±2.3	26.6±1.6*
3	75.1±8.9	23.4±3.4	51.6±6.9	45.4±1.5**	11.3±1.3	34.3±1.6
4	77.1±9.9	24.5±3.4	52.6±6.9	48.0±1.7	12.9±1.1	35.1±1.6
5	82.0±10.4	25.7±4.1	56.2±6.6	44.9±2.0**	13.3±1.1	31.6±1.8**
6	83.1±7.8	25.6±6.1	57.5±3.8	44.7±3.7**	16.9±1.1***	27.8±3.3*
7	96.6±7.5	36.3±4.5****	60.3±3.7	44.6±1.9**	16.3±0.6***	28.3±1.6*

\* достоверно ниже по сравнению с 1 дпи ( $p < 0.05$ )

\*\* тенденция по сравнению с 1 дпи ( $p < 0.1$ )

\*\*\* тенденция к повышению по сравнению с 1 дпи ( $p < 0.1$ )

\*\*\*\* достоверно выше по сравнению с 1 дпи ( $p < 0.05$ )

В малых базофильных и полихроматофильных эритробластах количество РНК на всем протяжении болезни достоверно уменьшается, а в оксифильных эритробластах сохраняется лишь тенденция к уменьшению. При этом на всех сроках АЧС содержание РНК в них колеблется незначительно.

Таблица 6

Динамика изменений количества РНК в полихроматофильных и ортохромных эритроцитах при АЧС (у.е.)

Сутки	Полихроматофильные эритроциты			Оксифильные эритроциты		
	Клетка	Цитоплазма	Ядро	Клетка	Цитоплазма	Ядро
1	38.9±1.6	11.7±0.1	27.2±1.5	24.3±0.9	7.5±0.1	16.8±0.9
2	30.2±1.3*	6.8±1.5*	23.3±1.6	22.9±1.6	8.3±0.9	14.6±0.6
3	31.0±1.5**	10.1±1.6	20.9±1.3	24.4±1.8	10.2±1.4	14.2±1.1
4	30.9±2.9*	13.1±1.6	18.6±1.9*	23.2±1.8	10.7±1.7	12.5±0.8*
5	31.6±1.3**	13.5±0.6	18.1±0.7*	26.2±1.8	9.4±1.9	16.8±2.4
6	29.1±1.8*	10.2±1.9	18.9±2.4*	22.9±1.9	7.4±1.02	15.5±0.9
7	21.2±1.4*	9.3±1.1	15.9±1.2*	-	-	-

\* достоверно ниже по сравнению с 1 дни ( $p < 0.05$ )

\*\* тенденция по сравнению с 1 дни ( $p < 0.1$ )

Таким образом из таблиц видно, что изменение площадей всех ядерных форм эритроидного ряда, выброшенных в кровь в процессе острой формы АЧС, прямо пропорционально изменениям синтезируемого количества РНК во всех структурах исследуемых клеток.

### Биохимические исследования крови, мочи и кала свиней с острой формой АЧ

#### а. Гематологические исследования крови при АЧС.

Известно, что расшифровка клинического анализа крови осуществляется в несколько этапов, во время которых оцениваются основные показатели крови. Это позволяет оценить и классифицировать патологическое состояние.

Таблица 7

Основные показатели клинического анализа крови свиней в динамике острой АЧС

Группы	Контр.	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
ККК 106/mm <sup>3</sup>	7.1±0.9	7.5±1.0	7.5±1.0	6.9±0.8	6.3±0.9	5.5±0.9**	4.9±0.8*	4.6±0.8*
Средний объем эритроцитов (μm <sup>3</sup> )	6.8±0.3	7.1±0.9	6.3±1.0	6.2±1.0	6.2±0.8	6.2±0.8	6.1±0.7**	6.1±0.6**
Гематокрит (%)	48±3.0	53±4.3	47±2.9	43±4.0	39±2.8**	34±2.9*	30±2.5*	28±2.2*
Средняя масса белка в Э (pg)	18.2±2.1	21±2.2	20±2.7	16.8±2.5	17.6±1.8	16.5±2.2	15.2±1.9**	13.5±2.0*

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

\*\* тенденция по сравнению с контролем ( $p < 0.1$ )

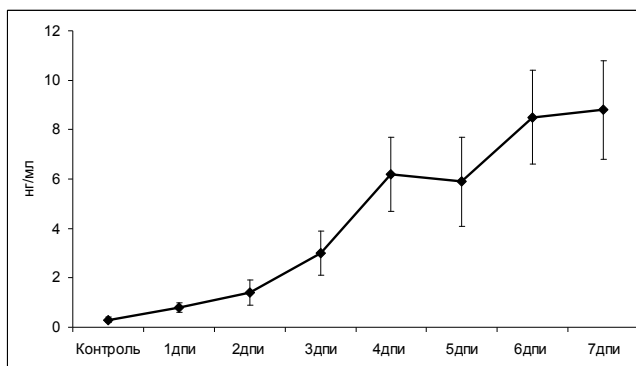
Из таблицы 7 следует, что среднее содержание эритроцитов в крови, начиная с 5 дни, снижается, что является хорошо известным показателем. При этом на терминальной стадии заболевания происходит снижение гематокрита. Обычно, определение гематокрита используется для оценки состояния эритроцитарной системы в целом при различных

заболеваниях: состояниях, связанных с изменением объема циркулирующей крови, и в частности анемиях, а также служит ориентиром для суждения о гемоконцентрации и гемодилюции (Nervas, 2001). Надо заметить, что согласно данным литературы (Shlamms, 2006), снижение гематокрита указывает либо на анемию, либо на увеличение количества жидкой части крови (уменьшение количества эритроцитов в плазме, связанное с увеличением общего объема плазмы). Так как в наших экспериментах у контрольных животных не наблюдалось снижения гематокрита, а трансфузия солевых растворов полностью исключалась, можно полагать, что причиной снижения гематокрита явилась анемия, вызванная АЧС.

Из таблицы 7 также следует, что средний объем эритроцитов (MCV) на терминальной стадии АЧС также снижается. Эритроциты с малым средним объемом встречаются при микроцитарной анемии, железодефицитной анемии (Shlamms, 2006). В эти же сроки наблюдается достоверное снижение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците (MCH), что позволяет классифицировать анемическое состояние как гипохромное (Shlamms, 2006).

#### **б. Определение эритропоэтина в плазме крови свиней при АЧС.**

Эритропоэтин - почечный гормон, который контролирует эритропоэз. Из данных литературы известно, что продукция эритропоэтина зависит от соотношения между потребностями тканей в кислороде и его доставкой: почки и печень секретируют эритропоэтин в ответ на гипоксию.



**Рис. 6.** Содержание эритропоэтина (ЭПО) в крови у свиней в динамике острой АЧС

Как следует из рис. 7, количество ЭПО в плазме крови с первых дней болезни значительно увеличивалось, а на терминальной стадии (6-7 дни) уже в 30 раз превосходило уровень ЭПО в контрольной группе ( $p < 0.001$ ) (рис.6). Повышенное содержание ЭПО отмечается при вторичных эритремиях, анемиях, опухолях почек, надпочечников и мозжечка, поликистозе почек, а также при хронических обструктивных заболеваниях бронхов и легочном фиброзе, при отторжении тканей после пересадки от донора и при кровопотерях. С учетом данных, полученных от контрольных животных (которые впоследствии заражались вирусом), можно полагать, что повышение ЭПО в крови больных АЧС животных явилось следствием возникновения гипоксии (анемии).

#### **в. Биохимический анализ крови свиней при АЧС.**

Как видно из таблицы 8, в процессе заболевания наблюдается билирубинемия, при которой как прямой, так и непрямой билирубин значительно повышаются, однако если прямой билирубин, увеличиваясь к терминальной стадии болезни более, чем в три раза, достоверно отличается от количества билирубина в крови больных свиней на первые

сутки заболевания ( $p < 0.01$ ), то различия по количеству непрямого билирубина в крови, имея тенденцию к повышению с первых дней болезни, уже на заключительной стадии достоверно отличаются от его содержания в первые сутки заболевания ( $p < 0.001$ ).

Таблица 8  
Определение химических компонентов сыворотки в контроле и свиней с АЧС

Параметры	контроль	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни
Билирубин ( $\mu\text{mol/l}$ )	<20	25.1 $\pm$ 2.3	41.0 $\pm$ 5.7 *	51.0 $\pm$ 7.3*	52.0 $\pm$ 8.4*	62.0 $\pm$ 9.1*	76.0 $\pm$ 9.3*
Непрямой ( $\mu\text{mol/l}$ )	1.8-20	22.8 $\pm$ 3.0	27.0 $\pm$ 4.9	36.0 $\pm$ 5.6	35.0 $\pm$ 6.0	43.0 $\pm$ 7.2	54.0 $\pm$ 8.7
Прямой ( $\mu\text{mol/l}$ )	0.9-4.5	2.3 $\pm$ 0.1	14.0 $\pm$ 3.0*	15.0 $\pm$ 3.9*	17.0 $\pm$ 5.1*	19.0 $\pm$ 4.0*	22.0 $\pm$ 6.8*
Креатинкиназа (У/Л)	<300	257.0 $\pm$ 36.0	222.0 $\pm$ 32.0	180.0 $\pm$ 31.0	153.0 $\pm$ 24.0	192.0 $\pm$ 29.0	263.0 $\pm$ 38.0
Креатинин ( $\mu\text{M/l}$ )	50.0-110.0	81.0 $\pm$ 16.0	79.0 $\pm$ 16.0	60.0 $\pm$ 13.0	131.0 $\pm$ 29.0	90.0 $\pm$ 15.0	88.0 $\pm$ 16.0
Лактатдегидрогеназа (У/Л)	200.0-500	410.0 $\pm$ 103.0	1018.0 $\pm$ 322.0	1334.0 $\pm$ 410.0	3223.0 $\pm$ 972.0	2987.0 $\pm$ 625.0	1996.0 $\pm$ 543.0

\* достоверно по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ - $p < 0.001$ )  
\*\* число инверсий 2 ( $p < 0.1$ )

Значительное повышение уровня лактатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы в крови, ввиду большой ошибки средней арифметической, недостоверно отличается от таковой на всем протяжении болезни ( $p < 0.5$ ).

#### г. Анализ мочи свиней при АЧС.

С целью выявления причин возникновения анемии нами был проведен общий анализ мочи свиней в динамике острой АЧС, который выявил присутствие патологии с первых дней болезни, но она нарастала, начиная со второго дня болезни. и выражалась в развитии билирубинурии и протеинурии в моче у больных животных. Последняя обнаруживалась с четвертых суток, и с того же времени цвет мочи становился темно желтым. Билирубинурия является следствием повышенного распада гемоглобина (гемолитическая анемия, полицитемия, рассасывание массивных гематом) (Osborne, Stevens, 1981).

#### д. Анализ осадка мочи свиней при АЧС.

В осадке мочи на заключительной стадии заболевания, появляется большое число лейкоцитов, плоскоклеточных эпителиальных клеток и эритроцитов крови, а также почечных и переходных эпителиальных клеток, и гиалиновых и гранулярных цилиндров. Полученные данные иллюстрируют нефропатию, часто развивающуюся на заключительной стадии АЧС (Hervás et al, 1996).

#### е. Анализ кала на скрытую кровь у свиней при АЧС.

Использование теста на скрытую кровь показало, что, хотя кишечное кровотечение очень часто обнаруживается в острых формах АЧС, в нашем случае скрытая кровь в кале была обнаружена только у 10-50% больных свиней в зависимости от стадии заболевания. Максимальное количество свиней с кишечными кровотечениями на терминальной стадии болезни (5-6 дни) не превышало 50%, следовательно оно является причиной возникновения анемии при АЧС, вследствие незначительности кровопотери на поздних стадиях заболевания.

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ АЧС

Из таблицы 9 видно, что под действием вируса эритроидный росток в костном мозге на всем протяжении заболевания угнетается, и на терминальной стадии заболевания количество ядерных форм эритроидных клеток КМ достоверно снижается. Анализ миеограммы выявил уменьшение количества клеток всех ростков кроветворения и опустошение костного мозга на терминальной стадии.

Таблица 9

Распределение ядерных форм эритроидных клеток по степени зрелости в костном мозге свиней при острой форме АЧ (%)

Клетки	Сроки с момента инфицирования				
	Контроль	2 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки
Эритроидные клетки	31.9±2.5	25.1±1.3*	23.8±2.2*	24.3±3.1*	23.0±1.5*
Проэритробласты	6.0±0.9	7.3±1.3	5.8±1.0	7.5±1.0	8.2±1.0
Базофильные эритробласты	11.5±1.1	5.6±0.7*	3.1±0.3*	4.3±1.0*	2.4±0.8*
Орто- и полихром. Эритробласты	14.4±2.7	12.2±1.1	14.9±2.4	12.5±3.1	12.4±1.7

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

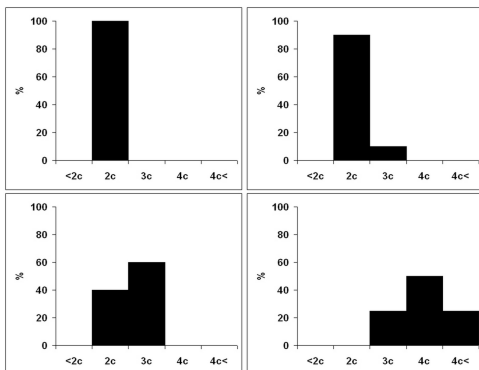
### Динамика изменений площади ядерных форм эритроидных клеток костного мозга здоровых и больных АЧ свиней

Цитоморфометрическое исследование площади клеточных структур всех ядерных форм эритроидных клеток КМ при воздействии вируса АЧС, показало, что площадь как клеток в целом, так и цитоплазмы, ядра и ядрышек проэритробластов на всем протяжении болезни сохраняет тенденцию к увеличению, и лишь на 5 дни площадь всех клеточных структур проэритробластов недостоверно уменьшается. В отличие от проэритробластов площадь больших и малых эритробластов и их ядер на всем протяжении болезни вплоть до терминальной стадии заболевания недостоверно уменьшается.

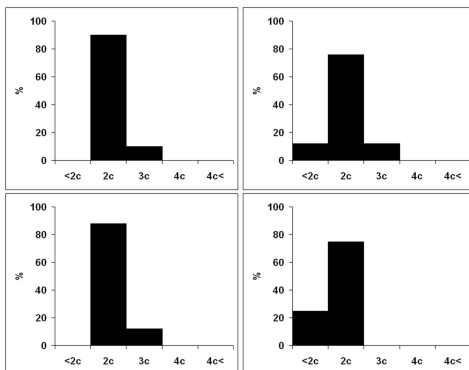
### Динамика изменений содержания ДНК в ядрах эритробластов костного мозга при острой форме АЧС

На рисунке 7, представлено распределение всех морфологически определяемых ядерных эритроидных клеток КМ здоровых свиней по классам плоидности. Так, оксифильные эритробласты КМ представлены диплоидными клетками, полихроматофильные эритробласты - в основном диплоидны с небольшим количеством гипердиплоидных клеток (около 7%), базофильные эритробласты почти поровну представлены диплоидными и гипердиплоидными клетками, а среди проэритробластов около половины популяции представлены тетраплоидными клетками и в небольшом количестве гипердиплоидные и гипертетраплоидные клетки.

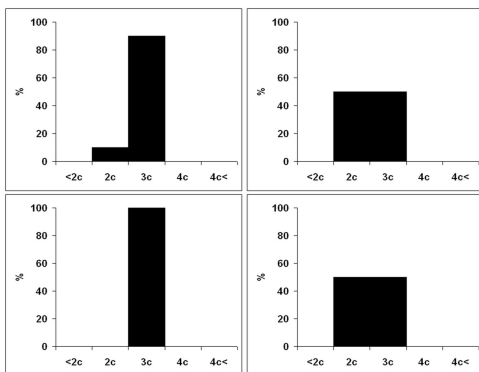
На рисунке 8 представлены оксифильные эритроциты КМ свиней, начиная с начальной стадии АЧС. На 2 дни оксифильные эритроциты в целом диплоидны и только около 5% клеток оказалось гипердиплоидными. Уже с 3 дни появляются гиподиплоидные оксифильные эритроциты, число которых не превышает 10%, но к 7 дни, т.е. к терминальной стадии заболевания, их количество составляет 25% всей популяции оксифильных эритроцитов. Важно отметить, что гиподиплоидия оксифильных эритроцитов является, в основном, следствием утраты в процессе терминальной дифференцировки части хроматина.



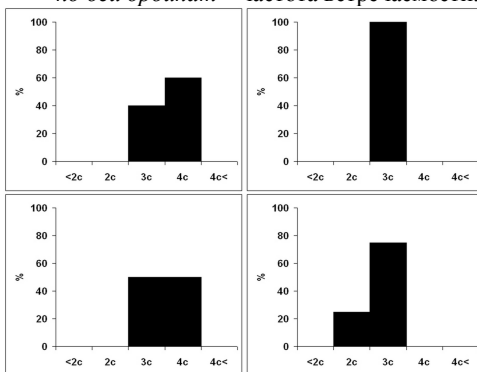
**Рис.7.** Распределение ядер эритроидных клеток КМ свиней по классам плоидности в динамике острой формы АЧ 1 -7- дни после инфекции



**Рис.8.** Распределение ядер оксифильных эритроцитов КМ свиней по классам плоидности в динамике АЧС 2,3,5 и 7 дни после инфекции  
*По оси абсцисс – единицы плоидности, по оси ординат – частота встречаемости.*



**Рис.9.** Распределение ядер полихроматофильных эритроцитов КМ свиней по классам плоидности в динамике АЧ. На 2, 3, 5 и 7 дни после болезни



**Рис.10.** Распределение ядер базофильных эритроцитов КМ свиней по классам плоидности в динамике АЧ. На 2, 3, 5 и 7 дни после инфекции  
*По оси абсцисс – единицы плоидности, по оси ординат – частота встречаемости.*



В отличие от оксифильных, полихроматофильные эритробласты КМ на начальном этапе заболевания представлены диплоидными и гипердиплоидными клетками (рис. 9). В динамике АЧС, в популяции полихроматофильных эритробластов, как и у ряда других эритробластов, происходят изменения, характеризуемые как сдвиг распределения ДНК вправо, скорее всего вызванный блоком большей части полихроматофильных эритробластов в G2 фазе. Близкие к этим изменениям характерны для базофильных эритробластов (рис. 10). В проэритробластах отсутствуют диплоидные клетки, и на 2 дни основную массу составляют триплоидные и тетраплоидные клетки, но уже на 3 дни, 5 дни и 7 дни в появляются гипертетраплоидные проэритробласты (от 60% до 80%), что свидетельствует о том, что в ответ на массовую гибель эритроцитов с первых дней болезни происходит активация размножения эритроидных клеток и, в частности, проэритробластов и базофильных эритробластов.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что во всех ядерных эритроидных клетках КМ, кроме оксифильных эритробластов, под действием вируса АЧС происходит смещение гистограммы распределения ДНК вправо. Последнее, несомненно, является следствием блока клеток в фазе G2 митотического цикла. В целом изменение митотической активности клеток под воздействием вируса АЧС исследовано неполно, и имеется множество противоречивых данных. Однако, в клетках лейкоцитарного происхождения показано ускорение пролиферации (Wardley, 1982, Knudsen RC, Genovesi, 1987, Vilanova et al, (1999). Сходные данные получены и в отношении моноцитов/макрофагов (Enjuanes, et al, 1977). Следовательно, содержание ДНК в ядрах исследуемых клеток должно снижаться. Наблюдаемый нами обратный процесс в ранних эритропоэтических клетках следует объяснить нарушением функциональной активности в центральных макрофагах эритробластических островков и/или разрушением эритробластических островков в КМ при инфицировании вирусом АЧС.

### **Динамика изменений содержания РНК в эритробластах КМ свиней при острой форме АЧ**

Содержание РНК в проэритробластах крови свиней на всем протяжении болезни вплоть до терминальной стадии достоверно увеличивается, за исключением 5 дни, когда имеет место недостоверное его уменьшение как в клетках в целом, так и в цитоплазме, а в ядре и в ядрышках уменьшение количества РНК наблюдается и на 3 дни.

В малых базофильных и полихроматофильных эритробластах, количество РНК на всем протяжении болезни достоверно уменьшается, а в оксифильных эритробластах сохраняется лишь тенденция к уменьшению. При этом, на всех сроках АЧС содержание РНК в них колеблется незначительно. При сравнении содержания РНК в клетках и ядрах полихроматофильных и оксифильных эритробластов оказалось, что вплоть до четвертых суток, содержание РНК в них достоверно отличается друг от друга, а затем вплоть до терминальной стадии сохраняется лишь тенденция к уменьшению.

### **Эритробластические островки КМ мозга свиньи в норме и в динамике острой АЧС**

Нами показано, что под действием вируса АЧС происходит значительное уменьшение ядра макрофага ЭО. Нарушение метаболизма и функциональных свойств макрофага ЭО КМ может стать одним из звеньев нарушения функций эритрона, т.к. именно макрофаги ЭО могли уменьшить способность к созданию благоприятной "экологической ниши" для созревания эритробластов. В пользу данного предположения говорит и уменьшение количества эритробластов в ЭО, также выявленное нами.

Из вышесказанного, можно полагать, что острая форма АЧС затрагивает эритропоэтическую функцию макрофагов.

## ВЫВОДЫ

1. С первых суток после заражения вирусом АЧС у свиней в крови появляются ядерные формы эритроидных клеток, и запускаются механизмы микро- и макроцитоза, которые способствуют ускоренной регенерации эритроидной популяции и гемоглобинизации крови.
2. Обнаружена особая форма эритроцитов, количество гемоглобина в которых соответствует среднему содержанию его в нормоцитах при площади значительно более низкой по сравнению с площадью нормоцитов.
3. Анализ клеточного состава костного мозга выявил активацию эритропоэза на ранних стадиях заболевания, и его угнетение на поздних. В динамике заболевания выявлено уменьшение площади ядер центрального макрофага эритробластического островка.
4. Исследование распределения ядерных форм эритроидных клеток по степени их зрелости показало, что с 1 дпи в крови появляются поздние эритробласты, а на 2 дпи проэритробласты.
5. Анализ распределения ядер эритроидных клеток крови и костного мозга по классам плоидности выявил, что при АЧС происходит их сдвиг вправо, что свидетельствует об их незаконченной дифференцировке. У проэритробластов происходит увеличение числа клеток с 4<sup>нс</sup> ядрами, свидетельствующее об ускоренном синтезе ДНК.
6. Среднее количество эритроцитов в крови с развитием заболевания снижается, одновременно с этим снижается средний объем эритроцитов, а на терминальной стадии заболевания происходит снижение гематокрита.
7. В динамике АЧС наблюдается билирубинемия, при которой повышаются значения как прямого, так и непрямого билирубина. Одновременно с этим происходит подъем уровня эритропоэтина в сыворотке крови больных свиней.
8. Общий анализ мочи выявил билирубинурию и протейнурию с первых дней болезни, что свидетельствует о гемолизе. Анализ кала и мочи у большинства свиней с АЧС не выявил существенной геморрагии.
9. Наши данные впервые выявили развитие анемического процесса при острой форме АЧС (генотип 2). Основным механизмом развития анемии является гемолиз. На начальной стадии острой АЧС включаются механизмы, компенсирующие данную патологию (ускоренный выброс в кровь из костного мозга ядерных форм эритроидных клеток, появление патологических форм эритроцитов, макроцитоз и микроцитоз).

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Nersisyan N. Peripheral red blood cells pathology during the ASFV. // Biological journal of Armenia. 2013; 35(1): 113-115.
2. Karalova E, Voskanyan H, Nersisyan N, Abroyan L, Arzumanyan H, Zakaryan H, Karalyan N, Karalyan Z. Evaluating porcine red blood cells in acute African swine fever virus (genotype II) infection in peripheral blood. // Journal of Advances in Biology. 2014; 3(2):227-232.
3. Нерсисян Н. Динамика изменений числа, размеров и содержания гемоглобина в эритроцитах периферической крови при африканской чуме свиней. // Биолог. журн. Армении. 2014; 4(66): 6-10.

4. 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. // Vet Microbiol. 2014; 174(1-2):223-228.
5. Nersisyan N.H., Hakobyan A.S., Simonyan L.A., Misakyan A.R., Karalyan Z.A., Karalova E.M. Disorders of erythropoiesis during acute African swine fever. // Proceedings of the Yerevan State University. 2014; 3:46-50.
6. Азнаурян А.В., Нерсисян Н.Г., Татоян М.Р. Эритробластемия при острой форме Африканской чумы свиней. // Вопросы теоретической и клинической мезицины. 2014; 7(96):52-54.

## ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ ՆԱՐԵԿ ՀՐԱՉՅԱՅԻ

### ԷՐԻԹՐՈՂՈՆԵԶԻ ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԸ ՍՈՒՐ ԱՖՐԻԿԱԿԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ԺԱՄԱՆԱԿ ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

Էրիթրոպոեզի ախտաբանությունը, որը զարգանում է խոզերի Աֆրիկական ժանտախտի (ԽԱԺ) սուր ձևի ֆոնի վրա, արտահայտվում է արյան էրիթրոցիտների քանակի նվազմամբ, միկրոցիտների առաջացմամբ, որոնց քանակը հիվանդության զագաթնակետին հասնում է համարյա թե բոլոր էրիթրոցիտների քանակի մեկ երրորդին: Հիվանդության 4-րդ օրվանից սկսած հայտնաբերվում են ախտաբանական էրիթրոցիտներ, որոնց քանակն աճում է հիվանդության ընթացքում և տերմինալ փուլում հասնում է էրիթրոցիտների պոպուլյացիայի 14%: Հեմոգլոբինով նորմալ հագեցվածության դեպքում, որը համապատասխանում է էրիթրոցիտներում վերջինիս միջին պարունակությանը նորմայում և արժանահավատորեն ավելի բարձր պարունակությանը, քան միկրոցիտներում, այդ էրիթրոցիտների մակերեսը նշանակալիորեն փոքր է, քան ԽԱԺ համապատասխան փուլում միկրոցիտների մակերեսը: Կարելի է ենթադրել, որ դրանց առաջացումը կապված է էրիթրոպոեզի էրիթրոցիտների նվազման փոխհատուցմանն ուղղված տարբեր համակարգերի կոմպենսատոր ռեակցիայի հետ: Միաժամանակ հիվանդության առաջին օրերից սկսած ԱՄ պատենշային ֆունկցիաների խախտման հետևանքով արյան մեջ առաջանում են էրիթրոիդային բջիջների վաղ ձևեր: Հետևաբար, արյունաստեղծման կարգավորման համակարգն արդեն անեմիայի զարգացման սկզբից և, հատկապես, ճգնաժամի պահին դիմում է անհետաձգելի միջոցների՝ սկզբնական փուլում արյան մեջ արտանետելով ամեն բան, ինչը կարող է փրկել օրգանիզմը, այդ թվում հեմոգլոբին պարունակող էրիթրոբլաստեր: Հավանական է, որ դրանով կարելի է բացատրել ԽԱԺ դեպքում արյան մեջ վաղ բլաստերի հայտնաբերումը (Կարալովա, 2013): Մենք ցույց ենք տվել, որ ԽԱԺ դեպքում խոզերի մոտ հայտնաբերվել են տետրապլոիդ բջիջներ, որոնք պատկանում են ինչպես բազոֆիլ էրիթրոբլաստերին, այնպես էլ պրոէրիթրոբլաստերին: Դա վկայում է ոչ միայն օրգանիզմի կոմպենսատոր մեխանիզմների, այլ նաև վիրուս-դրոլված տարրի ներգրավման՝ հավանաբար մոնոցիտար-մակրոֆագալ համակարգի, ակտիվացման մասին: Բայց հիվանդության ավելի ուշ փուլերում ԽԱԺ վիրուսի ցիտոպատիկ ազդեցությունը մոնոցիտար-մակրոֆագալ համակարգի վրա և, մասնավորապես, էրիթրոբլաստիկ կոլոնիաների

կարևորագույն կումպոնենտի՝ կենտրոնական մակրոֆազի վրա, հանգեցնում է էրիթրոպոեզի ֆունկցիայի ճնշմանը:

Արյան շիճուկի կենսաքիմիական անալիզները հայտնաբերել են բիլիռուբինեմիա: Քաջ հայտնի է, որ որոշակի համախտանիշների դեպքում (օրինակ, հեմոլիզ) արյան շիճուկում բիլիռուբինի առաջացման բարձր մակարդակները հանգեցնում են ոչ կապակցված հիպերբիլիռուբինեմիայի:

Էրիթրոպոեզիսը երիկամային հորմոն է, որը վերահսկում է էրիթրոպոեզը՝ ազդելով էրիթրոիդային պրոլիֆերացիայի և տարբերակման վրա: Մեր կողմից ցույց է տրվել շիճուկում դրա բարձրացումը ԽԱԺ վերջին փուլերում: Սովորաբար դրա սինթեզը բարձրանում է հյուսվածքների հիպոքսիային ի պատասխան: Հյուսվածքներին թթվածնի առաքման գլխավոր տարբերակիչներից մեկն է հեմոգլոբինի խտությունը արյան մեջ: Հետևաբար, շիճուկային անեմիաների ժամանակ կարմիր բջիջների արտադրման դիսֆունկցիայի ու դեստրուկցիայի պատճառով բարձրացած էրիթրոպոեզիսը, սովորաբար բարձրանում է նորմալից բարձր՝ անեմիայի ծանրությանը համամասնորեն (de Klerk et al, 1981, Richmond et al, 2005): Հայտնի է, որ ԼԴՀ հաճախ կիրառվում է որպես հյուսվածքի վնասման մարկեր և, արյան էրիթրոիդ բջիջներում մեծ քանակություններով պարունակվելով, կարող է գործել որպես հեմոլիզի մարկեր, իսկ ԼԴՀ ակտիվության բարձրացումը շիճուկում կարող է հեմոլիզի մակարդակի ինդիկատոր հանդիսանալ (Tada, Watanabe, 1962, Kato et al, 2006): Չնայած բարձր արտանետումների պատճառով ԼԴՀ մակարդակի բարձրացման ոչ արժանահավատ լինելուն, ԼԴՀ բարձրացած մակարդակներ դիտվում էին վարակի 2-րդ օրվանից սկսած:

Մեզի կենսաքիմիական անալիզը և մեզի նստվածքի ուսումնասիրությունը հայտնաբերեց պրոտեինուրիա և հիպերբիլիռուբինեմիա, ինչը վկայում է երիկամների լուրջ պաթոլոգիայի մասին, այդուհանդերձ, մեր կողմից չի հայտնաբերվել արտահայտված հեմատուրիա:

Հայտնի է, որ անեմիան ծագում է երեք հիմնական պատճառներից՝ արյան կորուստ, արյան էրիթրոցիտային բջիջների արտադրության անբավարարություն կամ դրանց նշանակալի քայքայում: Համաձայն մեր արդյունքների, էրիթրոիդային բջիջների ներանոթային քայքայումը և արյան կորուստը հատկապես վարակի վերջին փուլում, կարող է անեմիայի պատճառ հանդիսանալ ԽԱԺ սուր ձևի դեպքում: Մեր տվյալները թույլ են տալիս գործնականորեն ամբողջությամբ բացառել հեմոռագիան որպես անեմիայի զարգացման առաջատար մեխանիզմ:

Այսպիսով, սույն ուսումնասիրության մեջ բացահայտվել են ԽԱԺ սուր ձևի ժամանակ հեմոլիտիկ անեմիայի նշաններ: ԽԱԺ վիրուսի համընդհանուր ընդունված առանձնահատկությունը կարող է նկարագրվել որպես հակավիրուսային պատասխանին մասնակցող բջիջները մանիպուլյացիայի ենթարկելով “տիրոջ” իմունային արձագանքի անջատման ունակություն: Դրա գործողությունը բնութագրվում է վիրուսի նշված ռեպլիկացիայով անոթային համակարգի և լիմֆատիկ հյուսվածքի կարգավորման խախտման հետ միասին: Տվյալ աշխատանքը նպաստում է ԽԱԺ պաթոգենեզի մեխանիզմների առավել խորը ընկալմանը և խորացնում է ոչ միայն ԽԱԺ պաթոգենեզի, այլ նաև այլ՝ տվյալ պաթոլոգիային մոտ հիվանդությունների մասին տեղեկատվությունը:

THE DISORDERS OF ERYTHROPOIESIS DURING ACUTE SWINE FEVER VIRUS

SUMMARY

Pathology of erythropoiesis, progressing on the background of acute form of African swine fever, becomes evident in decrease of number of red blood cells, appearance of microcytes which at the peak of disease reach almost one third of the total number of red blood cells. Starting from the 4<sup>th</sup> day of the disease pathological RBCs are detected for the first time; their number is increasing throughout the course of disease and at terminal stage it reaches 14% of RBC population. At normal haemoglobin density which corresponds to its average content in RBCs in a norm and for certain to a higher content than in microcytes, the area of those RBCs is considerably smaller than microcytes area at the corresponding stage of ASF. It can be assumed that their occurrence is related to compensatory reaction of various systems of erythropoiesis, directed to compensation of RBCs diminution. Along with this, starting from the first days of disease, as a result of disturbance of gut organisms barrier functions, early forms of erythroid cells appear in blood. Consequently from the beginning of anemia progression and particularly at the moment of crisis hemapoiesis regulation system resorts to emergency measures, discharging at the initial stage into the blood whatever can save the organism including hemoglobinated erythroblasts. Probably, it accounts for detection of early blasts in blood during ASF (Karalova, 2013). We have revealed that during ASF tetraploid cells belonging to basophilic erythroblasts as well as to proerythroblasts were detected among swine. This goes to prove involvement of not only compensatory mechanisms of the organism but also virus-challenged element, more likely activation of monocyte-macrophagal system. However at more advanced stage of the disease cytopathic effect of ASF virus on monocyte-macrophagal system and particularly on the most essential component of erythroblastic islands, i.e. central macrophage, brings to depression of erythropoiesis function

Biochemical analyses of blood serum detected bilirubinemia. It is well known than at certain syndromes (such as haemolysis) increased levels of bilirubin formation in the serum bring to unconjugated hyperbilirubinemia.

Erythropoietin is a renal hormone which keeps erythropoiesis under control, effecting on erythroid proliferation and differentiation. We have revealed its increase in the serum at the final stage of ASF. Generally its synthesis is increased in answer to tissular hypoxia. One of essential determinants of oxygen delivery to tissues is haemoglobin concentration in blood. Thus, serumal erythropoietin which is increased during anemia due to dysfunction of production and destruction of red cells, usually increases above the norm in

the ratio comparable to severity of anemia (de Klerk et al, 1981, Richmond et al, 2005). It is known that LDH is often used as a marker for tissue damage and being in erythroid cells of blood in a large number it may function as a marker for haemolysis; and increased activity of LDH in the serum may be an indicator of haemolysis level (Tada, Watanabe, 1962, Katoetal, 2006). In spite of unreliability of increase of LDH level as compared with control, due to high dispersion, increased levels of LDH were observed starting from the 2<sup>nd</sup> day after infection.

Biochemical analysis of urine and study of urocheras revealed proteinuria and hyperbilirubinemia which gives evidence of serious pathology of kidneys, however we have not revealed apparent hematuria.

It is known that anemia appears due to three basic following causes: blood loss, lack of production of erythroid cells of blood or their significant disruption. According to our results, intravascular disruption of erythroid cells and blood loss particularly at the last stage of infection may be a reason for anemia at acute form of ASF. Our data allow us to exclude hemorrhage completely as a leading mechanism in anemia progression.

Thus, in this research signs of haemolytic anemia detected at the acute form of ASF were revealed. Generally accepted feature of ASF virus may be described as ability to disconnect immune response of the “owner”, manipulating the cells which participate in anti-virus response. Its action is characterized by distinguished replication of the virus together with disturbance of regulation of vascular system and lymphatic tissue. This work favours more profound understanding of the mechanisms of ASF pathogenesis and extends information on pathogenesis of not only ASF but also other diseases close to this pathology.

