

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՄԻՍԱԿՅԱՆ ԱԼԼԱԵՂԻԿԻ

ԱՐՏԱՈՍԿՐԱԾՈՒԾԱՅԻՆ ԷՐԻԹՐՈՊՈՒԵԶԻ ԱԽՏԱԲԱՆԱԿԱՆ ԳՈՐԾԸՆԹԱՑՆԵՐԻ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՈՉԵՐԻ ԱՖՐԻԿՅԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ԴԵՊՔՈՒՄ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ ИНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

МИСАКЯН АЛЛА ЭДИКОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ВНЕКОСТНОМЗГОВОГО
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

Ատենախոսությունների թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանությունների ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ Կենս. գիտ. դոկտոր Ե.Մ. Կարապետյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Պ.Ա. Ղազարյան

Կենս. գիտ. թեկնածու Մ.Պ. Լազյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) համալսարան

Ատենախոսությունն պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. ապրիլի 15-ին, ժամը 15:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանությունների ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանություն 042 մասնագիտական խորհրդում (ՀՀ, 0014, Երևան, Յասրաբյան 7):

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

Սեղմագիրն առաքվել է 2016թ. մարտի 14-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
Կենս. գիտ. թեկնածու՝
Մկրտչյան

Գ.Մ.

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

Научный руководителъ: 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 Мкртчян Г.М.

ԱՆԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒ Ր ԲՆՈՒ ԹԱԳԻՐԸ

Աշխատանքի արդիականությունը: Խոզերի աճի արդիական ժամանակահատված (հսկծ) Խոզերին բնորոշ վիրուսային հիվանդությունն 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 ախտաբանությունը վերաբերվող մի շարք հարցեր, ինչպես օրինակ արյունաստեղծման, մասնավորապես, Երիթրոպոեզի ախտաբանական տեղաշարժերը և նրանց զարգացման մոլեկուլային մեխանիզմները դեռևս ուսումնասիրված չեն:

Չայտնի է, որ որոշ ախտաբանական վիճակներում, մասնավորապես սուր սակավարյունությունների դեպքում խթանվում է արտասկրածուծային, այսպես կոչված, «սթրես» Երիթրոպոեզը, որի գլխավոր օրգանն է փայծաղը: ԽՍԺ-ի դեպքում, որին բնորոշ են արյունազեղումները, արյունահոսությունները, սակավարյունությունը, վիրուսի ազդեցությամբ փայծաղի ախտակառուցվածքանությունը բավականաչափ ուսումնասիրված է, մինչդեռ նրանում արտասկրածուծային Երիթրոպոեզի ախտաբանությունը գործնականում գրեթե հետազոտված չէ: Յետաբարբությունն է ներկայացնում նաև ԽՍԺ-ի վիրուսի անմիջական ազդեցությունը ոսկրածուծի Երիթրոիդ բջիջների վրա *ex vivo* պայմաններում՝ առանց օրգանիզմի իմունային համակարգի միջնորդավորված ազդեցություն:

Աշխատանքի նպատակ և խնդիրները: Աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել Երիթրոպոեզի ախտաբանական գործընթացները Խոզերի աճի արդիական ժամանակահատվածում՝ կատարելով փայծաղի, ոսկրածուծի (*in vivo*) և ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի (*in vitro*) Երիթրոիդ բջիջների համեմատական վերլուծություն, ինչպես նաև բացահայտել փոխադրող մեխանիզմների դերը կենդանիների կենսունակության և հիվանդության ախտանշանների զարգացման ընթացքում: Այս նպատակի իրականացման համար դրվել էին հետևյալ խնդիրները.

1. Հիվանդության սուր ձևի կլինիկական արտահայտում՝ Խոզերի աճի արդիական ժամանակահատվածում վիրուսի (գենոտիպ II) միջմկանային ներարկման ճանապարհով:
2. Փայծաղում «սթրես» Երիթրոպոեզի ընթացքում առաջացող Երիթրոիդ բջիջների ձևաբանական ուսումնասիրություն և նրանց համեմատում ոսկրածուծային Երիթրոիդ բջիջների հետ ԽՍԺ-ի սուր ձևի դինամիկայում:
3. Ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի Երիթրոիդ բջիջների ձևաբանական ուսումնասիրություն ինտակտ և ԽՍԺ-ի վիրուսով վարակման պայմաններում:
4. Փայծաղի, ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի Երիթրոբլաստների բջջապեկտրոնոմետրիկ և բջջաքիմիական հետազոտություն ԽՍԺ-ի վիրուսով փորձարարական վարակման պայմաններում:

5. խոզերի արյան և հյուսվածքների կենսաքիմիական հետազոտությունն ԽԱՏ-ի ընթացքում երկաթի փոխանակության ուսու մնասիրությունն նպատակով:

Աշխատանքի գիտական նորույթը: Առաջին անգամ կատարվել է խոզերի փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների պրպուլյացիոն վերլուծությունն, նրանց ձևաբանական ուսու մնասիրությունն և համեմատում ոսկրածուծային էրիթրոիդ բջիջների հետ առողջ և ԽԱՏ-ի սուր ձևով հիվանդ կենդանիների մոտ հիվանդության դինամիկայում: Խոզերի ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոիդ բջիջների ձևաբանական ուսու մնասիրությունն ինտակտ և ԽԱՏ-ի վիրուսով վարակման պայմաններում: Փայծաղի, ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոբլաստների մակերեսային չափերի, նրանցում ԴՆԹ-ի, ՌՆԹ-ի և սպիտակուցների պարունակության բջջապեկտրոֆոտոմետրիկ հետազոտությունն ԽԱՏ-ի դինամիկայում: Ինչպես նաև ԽԱՏ-ի ընթացքում երկաթի փոխանակության ուսու մնասիրությունն խոզերի արյան և հյուսվածքների կենսաքիմիական հետազոտությունն միջոցով:

Գիտակիրառական նշանակությունը: ԽԱՏ-ի դեպքում խոզերի մոտ զարգացող էրիթրոպոեզի ախտաբանական գործընթացների և նրանց առաջացման մեխանիզմների ուսու մնասիրությունն ունի ինչպես հիմնարար, այնպես էլ կիրառական նշանակություն, քանի որ ոչ միայն ավելացնում է պատկերացումները վիրուսով պայմանավորված ախտաբանական փոփոխությունների մասին, այլ և հնարավորություն է ընձեռնում նոր տեսանկյունից վերլուծել ու մշակել ու հիվանդության կանխարգելման, բուժման արդյունավետ մոտեցումներ:

Ատենախոսության փորձարկումը: Ատենախոսության հիմնական դրույթները ներկայացվել և գեկուցվել 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, գրականակնարկից, փորձարարական մասից, հետազոտության արդյունքներից և նրանց քննարկումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից:

ՀԵՏԱՉՈՏՈՒ ԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

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

Վիրուս: Հետազոտության ունենալու օգտագործվել է ԽԱԺ-ի գենոտիպ II վիրուսը, որի տիտրը որոշվել է հեմադսորբցիայի եղանակով (Enjuanes et al., 1976, Wardley and Wilkinson, 1980): Փորձարարական վարակման համար վիրուսի չափաբաժինը կազմել է 10^4 հեմադսորբցիոն միավոր՝ $HADU_{50}/մլ$ 0,2 մլ/կգ-ի հաշվարկով: Ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի վարակի համար BD FalconTM տեսակի անոթում ցանված (10^6 բջիջ/մլ) ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի բջիջներին տրվել է վիրուս՝ $4 \log_{10} HADU_{50} /մլ$ չափաբաժնով:

Էրիթրոիդ բջիջների ձևաբանական վերլուծություն: Այս նպատակով ուսումնասիրվել են խոզերի փայծաղի պատճեններն (ներկումն ըստ Գիեմզայի) ու կտրվածքները (ներկումը հեմատոքսիլինով և Էոզինով ըստ Վան-Գիզոնի և Ռոմանովսկու (Pomeյc, 1954)), ծայրամասային արյան, ոսկրածուծի և ոսկրածուծի չխթանված առաջնային կուլտուրայի ֆիքսված քսուքները և պատճենները (ներկումը հեմատոքսիլին-Էոզինով՝ ըստ Ռոմանովսկու-Գիեմզայի (Pomeյc, 1954; Schlam, 2010)): Ուսումնասիրվող բջիջների տկոսային հարաբերության ստացման համար յուրաքանչյուր դեպքում միջինում դիտարկվել են 300-ից ավելի բջիջներ:

Բջջապեկտրոֆոտոմետրիա Էրիթրոիդ բջիջներում Դևե-ի (ներկումը հիմնային ֆոքսինով՝ ըստ Ֆյուլգենի), Ռևե-ի (ներկումը հալոցիանին-քրոմային շիբով՝ ըստ Չանրիդերի մոդիֆիկացված մեթոդի) և սպիտակուցների (ներկումը նաֆթոլ դեղինով) որոշման, ինչպես նաև բջիջների մորֆոմետրիկ ցուցանիշների փոփոխության ունենալի հայտնաբերման համար կատարվել է բջջապեկտրոֆոտոմետրիա՝ կիրառելով SMP 05 (OPTON) մանրադիտակ-ֆոտոմետրը՝ համարված տեսալսողիկով 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 համարման փաթեթը:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄՆԵՐ
Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի կլինիկական և պատասանոմիական դրսևորումները ԽԱԺ-ի վիրուսի միջմկանային ներարկման դեպքում:

Աֆրիկյան ժանտախտի կլինիկական և պատասանոմիական դրսևորումները մեր կողմից իրականացված փորձարկումների ժամանակ ԽԱԺ-ի վիրուսի միջմկանային ներարկման դեպքում չէին

տարբերվում գրականության մեջ նկարագրվածներից և վարակված խոզերը հասնում էին ազոնալ փուլ ին վարակման պահից սկսած 6-8-րդ օրերին: Հերձումների ժամանակ փայծաղի մակրոսկոպիկ ուսումնասիրությամբ հայտնաբերվել է օրգանի ծավալի մեծացում (երբեմն մի քանի անգամ), եզրերի կորացում, խոսատիճանի՝ փափկեցում: Կակղանը լցված էր արյունով, ուներ մուգ կարմիր երանգ, կտրվածքի վրա հեշտությամբ քերվում էր շիլայանման զանգվածի ձևով (հեմորագիկ սալ եսիտ): Ախտահարված օրգանում կային արյունազեղման բազմաթիվ օջախներ:

Փայծաղի էրիթրոիդ բջիջների հետազոտությունը հԱԺ-ի դեպքում

Առողջ և հԱԺ-ով հիվանդ խոզերի փայծաղի պարենքիմի հիմնական բջիջների պոպուլյացիոն վերլուծությունը հիվանդության դինամիկայում կատարվել է առաջին անգամ: Այն ներկայացվել է սալ ենոգրամի 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 նրանք 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 արժանահավասար ավելացում և ի հայտ են գալիս ատիպիկ լիմֆոցիտներ: Ինչպես երևում է նկար 1-ից, փայծաղում կորիզ պարունակող բջիջների քանակը հԱԺ-ի սուր ձևի ընթացքում էականորեն չի փոփոխվում: Հիվանդության ուշ փուլերում մահացող բջիջների քանակն ավելի քան 20 անգամ գերազանցում է ստուգիչ ցուցանիշներին:

Աղյուսակ 1

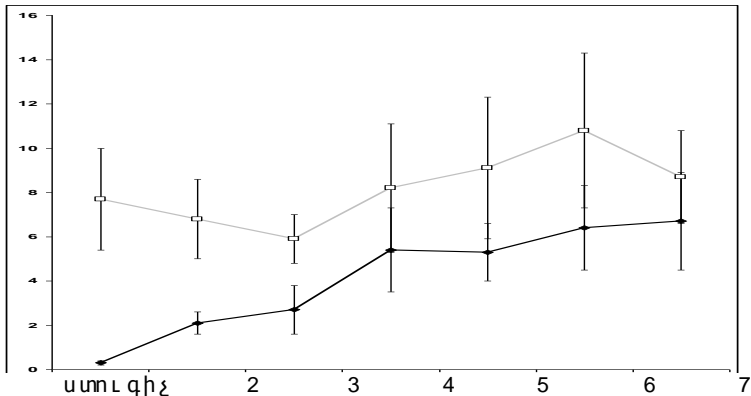
խոզի փայծաղի պարենքիմի հիմնական բջիջների հարաբերակցության սալ ենոգրամը հԱԺ-ի սուր ձևի դինամիկայում և ստուգիչում (%)

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*
լիմֆոբլաստներ	5.5±1.2	1.0±0.3	1.5±0.2	4.9±0.8	3.0±0.9	4.4±1.1
Լիմֆոիդ	73.6±4.	64.7±2.5	60.1±2.4	40.8±2.1*	35.0±2.0*	34.5±2.3

բջիջներ (ընդհ)	0					*
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 էյկոցիտներ	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 էյկոցիտներ	4.4±0.3	12.6±0.3	13.9±0.4	14.0±1.4	23.0±1.8	12.1±1.1
Էրիթրոիդ բջիջներ (ընդհ)	5.6±0.9	5.6±1.1	7.6±1.3	16.3±1.8*	19.8±1.9*	22.6±2.7*

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

Փայծաղում էրիթրոիդային պոպուլյացիայի ավելացումը պայմանավորված է առաջին հերթին օքսիֆիլ և պոլիբրոմատոֆիլ 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): Յարկ է նշել, որ հիվանդության ընթացքում, սկսած հետվարակային 3-րդ օրվանից փայծաղում հայտնաբերվում են նաև առիպիկ օքսիֆիլ էրիթրոբլաստներ (1%-ից պակաս), որոնք ստուգիչում բացակայում են:



Նկար 1- Սպլենոգրամի հիմնական բջջաբանական ցուցանիշները խժ-ի սուր ձևի դինամիկայում ըստ արսցիսների առանցքի՝ հետվարակային օրերը ըստ օրդինատների առանցքի՝ բջիջների քանակը (%)

(հվօ)

- քայքայված բջիջների քանակը 120×85մկմ տեսարար տու մ
- կորիզավոր բջիջների քանակը 120×85մկմ տեսարար տու մ

Աղյուսակ 2

Փայծաղի Էրիթրոիդ բջիջների բաշխումն ըստ հասունության և ստիճանի

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*
բազոֆիլ 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
պրլիքրոմատոֆիլ 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*
ասիպիկ պրլիքրոմ. Էրիթրոբլաստներ	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*
ասիպիկ օքսիֆիլ Էրիթրոբլաստներ	-	0.7±0.1*	0.7±0.1*	0.4±0.03	1.4±0.4*	0.3±0.1

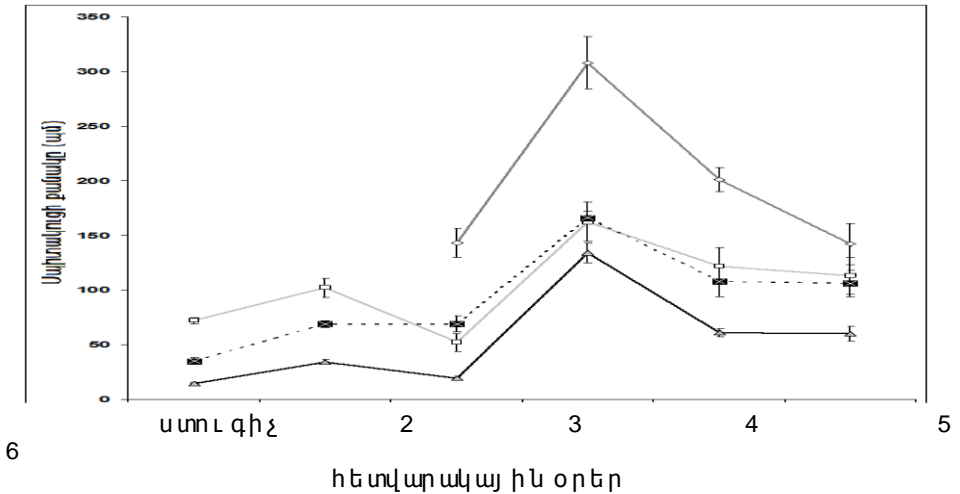
առողջ և խժ-ով հիվանդ խոզերի մոտ (%):

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

Այսպիսով՝ կարելի է եզրակացնել, որ հիվանդության դինամիկայում նշանակալիորեն ակտիվանում է Էրիթրոպոեզը և իմֆոպոեզի 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 պատասանական ձևեր, որոնք նորմայում բացակայում են փայծաղում:

Ոսկրածուծային և փայծաղային Էրիթրոպոեզների համեմատական բնութագիրը ԽԱԺ-ի սուր ձևի դեպքում

Հայտնի է, որ կայուն Էրիթրոպոեզը տեղի է ունենում ոսկրածուծում և նոր Էրիթրոցիտները ձևավորվում են անդադար և հաստատուն արագությամբ: Սուր սակավարյունության դեպքում սկսում է գերիշխել արտաոսկրածուծային, այլ կերպ կոչված «սթրես» Էրիթրոպոեզը, որի արդյունքում նոր Էրիթրոցիտները ձևավորվում են ավելի մեծ արագությամբ (Paulson, 2011; Sokolovsky, 2007): Սույն աշխատանքում կատարվել է ոսկրածուծում ձևավորված Էրիթրոիդ բջիջների (Нерсесян, 2015) և ԽԱԺ-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 ԽԱԺ-ի սուր ձևի ողջ ընթացքում ոչ արժանահավատ կերպով փոքր են, քան ոսկրածուծի համանման բջիջներում: Հետևաբար, թեև ԽԱԺ-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: ԽԱԺ-ի ընթացքում փայծաղի Էրիթրոիդ բջիջներում սպիտակուցի պարունակությունն ավել անում է (նկ. 2):



Նկար-2 Փայծաղի Էրիթրոիդ բջիջներում սպիտակուցի պարունակության փոփոխությունը ԽԱԺ-ի սուր ձևի դինամիկայում:

-☒- օքսիֆիլ էրիթրոբլաստներ
-□- բազոֆիլ էրիթրոբլաստներ
էրիթրոբլաստներ

-◇- պրոէրիթրոբլաստներ
-△- պրլիքրոմատոֆիլ

Փայծաղի և ոսկրածուծի էրիթրոիդ բջիջների մակերեսային փոփոխությունների համեմատական վերլուծությունը ուկրաինացի սուրճնի դեպքում (մկմ²)

	Մակ.	Պրոէրիթրոբլաստ		Մեծ բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Փոքր բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Պոլիբրոմատոֆիլ էրիթրոբլաստ		Օրթոբրոմ էրիթրոբլաստ	
		Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ
Ստուգիչ	Բջիջ	-	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±2.9	25.7±
	Ցիտ.	-	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±2.5	21.1±
	Կորիզ	-	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±2.0	14.6±
	Կորիզակ	-	9.1±0.9	8.5±1.5	-	-	-	-	-	-	-
3-րդ հվյո	Բջիջ	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±4.4	25.7±
	Ցիտ.	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±1.2	14.1±
	Կորիզ	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±4.3	11.6±
	Կորիզակ	10.1±0.7	6.2±0.6	8.0±1.4	-	-	-	-	-	-	-
4-րդ հվյո	Բջիջ	232.4±15.0	277.5±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±1.7	26.6±
	Ցիտ.	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±1.2	14.3±
	Կորիզ	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±1.6	12.3±
	Կորիզակ	12.2±4.6	8.8±0.5	4.7±0.7	-	-	-	-	-	-	-
6-րդ հվյո	Բջիջ	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±0.8*	26.4±
	Ցիտ.	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±0.9	13.5±
	Կորիզ	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±0.7	12.9±
	Կորիզակ	8.7±1.0	11.8±0.9	7.7±0.6	-	-	-	-	-	-	-

*p<0.1 միտում 4-րդ հվյո համեմատությամբ

Փ-փայծաղում, ՈՃ-ոսկրածուծում

Փայծաղի և ոսկրածուծի էրիթրոիդ բջիջների ՌՆԹ-ի պարունակության փոփոխության դինամիկան ԽՄԺ-ի սուր ձևի դեպքում (ա/մ)

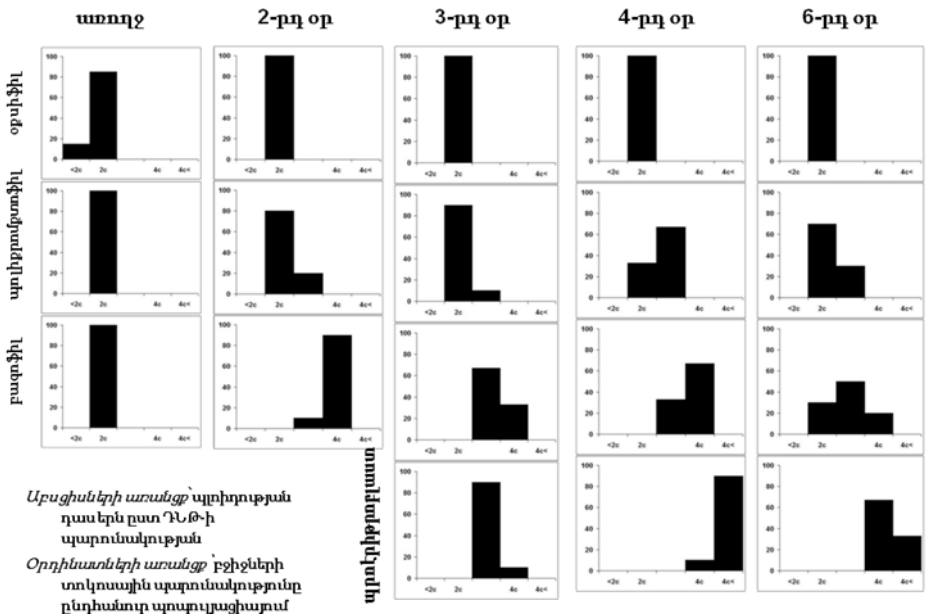
	ՌՆԹ (ա/մ)	Պրոէրիթրոբլաստ		Մեծ բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Փոքր բազոֆիլ էրիթրոբլաստ		Պոլիքրոմ. էրիթրոբլաստ		Օքսիֆիլ էրիթրոբլաստ	
		Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ	Փ	ՈՃ
Սուր փուլ	Բջիջ	-	257.5	107.7	132.9	54.4	63.8	45.0	49.2	33.2	38.3
	Ցիտ.	-	124.4	41.6	59.1	25.3	28.7	20.8	27.6	18.4	20.1
	Կորիզ	-	133.0	66.1	73.8	29.1	35.1	24.2	21.6	14.8	18.2
	Կորիզ	-	10.3	8.3	-	-	-	-	-	-	-
3-րդ հիւս	Բջիջ	209.9	236.2	106	111.9	49.0	50.5	36.6	36.0	32.6	35.5
	Ցիտ	121.5	123.4	44.8	45.2	22.2	23.0	18.7	19.4	19.4	20.2
	Կորիզ	88.4	112.8	61.2	68.6	26.8	26.4	17.9	16.6	13.2	15.3
	Կորիզ	9.4	9.4	7.4	-	-	-	-	-	-	-
4-րդ հիւս	Բջիջ	259.3*	249.7	99.2	121.4	50.5	51.6	38.9	35.7	30.7	32.8
	Ցիտ	156.5	132.4	36.2	62.8	17.4	22.4	16.7	20.1	18.5	21.6
	Կորիզ	92.8	117.2	52.9	58.7	43.1	29.2	22.2	15.6	12.2	11.2
	Կորիզ	13.9	5.7	4	-	-	-	-	-	-	-
6-րդ հիւս	Բջիջ	146.5*	170.9*	68.3**	98.6**	49.0	51.7***	34.7***	34.4***	22.7***	24.9***
	Ցիտ.	62.8*	71.3*	25.2**	38.9**	21.5	29.6	15.7	19.6	9.1	14.1
	Կորիզ	83.7	99.5**	43.1***	59.7	27.5	22.1	19.0	14.8	11.6	10.8
	Կորիզ	9.0	7.9	6.6	-	-	-	-	-	-	-

* արժանահավաստ ($p < 0.05-0.01$) բուլոբ օրերի համեմատության ամբ
 ** արժանահավաստ ($p < 0.05-0.01$) ստուգիչի համեմատության ամբ
 *** միտում ($p < 0.1$) ստուգիչի համեմատության ամբ

Փ-փայծաղում
 ՈՃ-ոսկրածուծում

ԴՆԹ-ի պարունակության փոփոխությունները վաղ ծաղի Էրիթրոիդ բջիջների կորիզավոր ձևերում ԽԱԹ-ի սուր ձևի դեպում:

Մեր հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ ԽԱԹ-ի ընթացքում տեղի է ունենում Էրիթրոիդ բջիջների կորիզների ըստ ԴՆԹ-ի պարունակության դասերի բաշխման հիստագրամի տեղաշարժ դեպի աջ (նկ.3): Առողջ խոզերի մոտ օքսիֆիլ Էրիթրոբլաստները ներկայացված են դիպլոիդ (85%) և հիպոդիպլոիդ (15%) բջիջներով (վերջիններս վկայում են այդ բջիջների կորիզազրկման և վերջնական հասունացման մասին): Յետվարակային 2-րդ օրվանից սկսած անհետանում են հիպոդիպլոիդ բջիջները, տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի պարունակության ալելացում: 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 պոլիֆերացիոն գործընթացների արագացում և/կամ բջիջների միտոտիկ ցիկլի արգելափակում G_2 փուլում: Այդ գործընթացը սկսվում է դեռևս հիվանդության վաղ փուլերում (2-րդ հվօ) և ավարտվում 4-րդ հվօ: Պրոէրիթրոբլաստների և մյուս վաղ Էրիթրոբլաստների պոլիպոիդացումը կարող է լինել սթրեսի և/կամ ախտաբանության նկատմամբ հարմարվողականության արդյունք:



Նկար 3 - Փայ ծաղի Էրիթրոիդ բջիջների կորիզների բաշխումն ըստ
ԴՆԹ-ի պոլիմորֆան (c) դասերի

**Երկաթի փոխանակության խանգարումը և նրազարգացման
մեխանիզմը
ԽԱՄ-ի դինամիկայ ու մ:**

Ինչպես 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 Երիթրոցիտների վրա (Xu et al., 2015), Երիթրոպոեզի նախորդ բջիջների ախտահարումը վիրուսով (Sornjai et al., 2014) և այլն: ԽԱՄ-ի դեպքում, որն ընթանում է ներանոթային հեմոլիզով (Нерисиян Н.Г., 2015), հետազոտության առաջին փուլում է մղվել երկաթի հնարավոր կուտակման ուսումնասիրությունը տարբեր օրգանների հյուսվածքներում, նախ և առաջ լյարդում, քանի որ ներանոթային հեմոլիզի դեպքում այդ անմեջ մեծանում է լուծված հեմոգլոբինի խտությունը (հեմոգլոբինեմիա), տեղի է ունենում նրա արտազատում մեզի միջոցով, ինչպես նաև քայքայումից առաջացած երկաթ պարունակող գունակների կուտակում բջիջներում: Այսպիսով՝ կիրառելով լյարդում 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 Երիթրոպոեզի խանգարումների զարգացման և ընդհանուր առմամբ այդ անհամակարգի հոմեոստազի խախտման մեջ՝ մեր աշխատանքի հաջորդ փուլը հանդիսացել է նախաորբոքային ցիտոկինների (ԻԼ-1β, ԻԼ-6, ԻԼ-8, ՈւՆԳ-α) շիճուկային մակարոնների հետ երկաթի փոխանակության, հեմատոկրիտի և Երիթրոպոեզի մակարոնի հիմնական ցուցանիշների հնարավոր փոխապակցության ուսումնասիրությունը: Տվյալ ցիտոկինների ընտրության պատճառը նրանց ունեցած դերն է այդ անախտաբանության մեջ՝ որպես սակավարյունության զարգացման միջնորդանյութերի (Atkins et al., 1995, Davenport, 1994): Այսպիսով, որպես հիմնական ցուցանիշներ ընտրել ենք նախկինում ուսումնասիրված հեմատոկրիտի, Երիթրոպոեզի (Нерисиян Н.Г., 2015) և մեր կողմից հետազոտված նախաորբոքային ցիտոկինների շիճուկային մակարոնների և հյուսվածքներում երկաթի կուտակման (Zakaryan H., Misakyan A. et al., 2015) ցուցանիշները: Մեր կողմից ցույց է տրվել բոլոր նախաորբոքային ցիտոկինների շիճուկային մակարոնների, Երիթրոպոեզի և լյարդի հյուսվածքում երկաթի կուտակման արտահայտված և արժանահավատ հակադարձ կորելյացիոն կապ հեմատոկրիտի ցուցանիշների հետ (աղ. 5), որը կարող է մեկնաբանվել հոգուտարյան 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 պատասխանության հեմոլիտիկ բնույթի մասին տվյալները:

Աղյուսակ 5

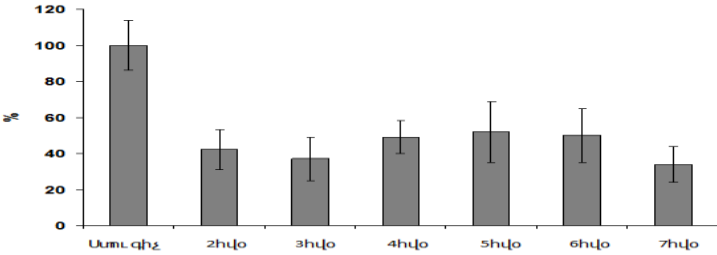
Հեմատոկրիտի, Էրիթրոպոեզի, ինտերլեյկինների, ՈւՆԳ-α-ի և երկաթի հարաբերակցությունը ԽԱԺ-ի դինամիկայում (արժեքները վերցված են Zakaryan H., Misakyan A. et al.,(2015) համահեղինակային աշխատանքից)

	Հեմատոկրիտ	ԻԼ-1β	ԻԼ-6	ԻԼ-8	ՈՒՆԳ-α	Fe-ը հյուսվածքում	ԷՊՈ
Հեմատոկրիտ	1	-.976**	-.901**	-.906**	-.769*	-.920**	-.952**
ԻԼ-1β	-.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-α	-.769*	.844**	.876**	.698	1	.554	.716*
Fe-ը հյուսվածքում	-.920**	.861**	.701	.871**	.554	1	.826*
ԷՊՈ	-.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: Արսցիսների առանցքը՝ հետվարակային օրերը,

օրդինատների առանցքը՝ կղզյակների քանակությունը նույն արտահայտված %-ով:

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

Էրիթրոպեզը խզերի ոսկրածուծի առաջնային չխթանված կուլտուրայում:

Հետազոտությունների ընթացքում առաջին անգամ մեր կողմից կատարվել է խզերի ոսկրածուծի առաջնային չխթանված կուլտուրայի (ՈԱԿ) էրիթրոիդ բջիջների ուսումնասիրությունը հԱժ-ի վիրուսով *in vitro* վարակման դինամիկայում կուլտիվացման չորս օրերի ընթացքում: Տույց է տրվել, որ չնայած կուլտուրայում վիրուսի վերարտադրությանը՝ էրիթրոիդ շարքի բջիջների պարունակումը ցուցանիչները չեն ենթարկվել նրա ազդեցությանը և բջիջների քանակության ակնհայտ տեղաշարժեր համեմատած ստուգիչի հետ չեն գրանցվել (աղ. 6):

Աղյուսակ 6

խզի ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի բջջային կազմի փոփոխությունը ինտակտ և հԱժ վարակի ընթացքում:

Բջիջներ	Կուլտիվացման ժամկետները							
	24 ժ	24 ժվհ	48 ժ	48 ժվհ	72 ժ	72 ժվհ	96 ժ	96 ժվհ
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
Պոլիբրոմ., 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

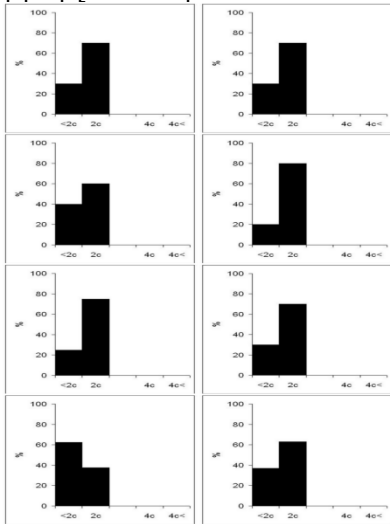
Ատրիպիկ լիմֆոցիտ	-	3.4±1.2**	-	3.9±2.2**	-	10.8±0.9* *	-	1.5±0.3**
---------------------	---	-----------	---	-----------	---	----------------	---	-----------

*կուլ տիվացման 4-րդ օրը Լիմֆոբլաստների քանակը կտրուկ նվազել է, շատ նմուշներում բացակայել, այդ իսկ պատճառով նրանց հաշվարկ չի կատարվել

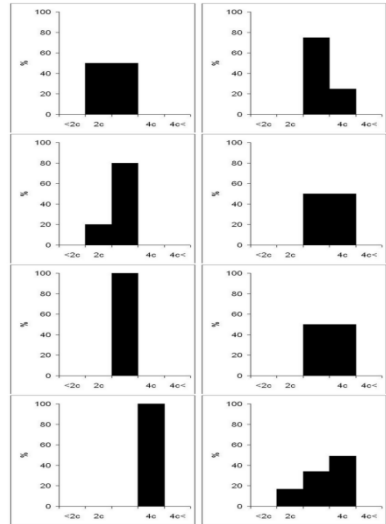
**արժանահավատ է համապատասխան ստուգիչի համեմատությամբ

Խոզի ՈԱԿ-ի բջիջներում ԴՆԹ-ի միջին պարունակությունը 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 կոզյակների քայքայումը կուլտուրայի ստացման ընթացքում (Նկ. 5):

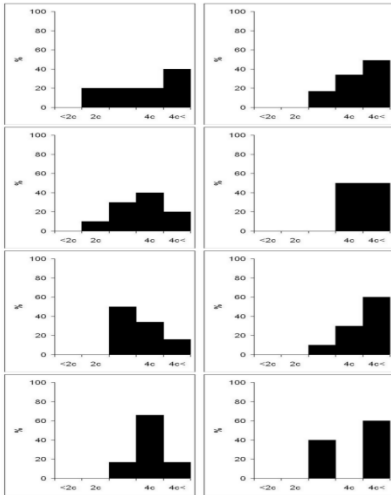
ուշ Էրիթրոբլաստներ
Էրիթրոբլաստներ



բազոֆիլ



արոերիթրոբլաստներ



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

Աբսցիսների առանցք՝
 բջիջների պլոիդությունն
 արտահայտված c միավորով:

Օրդինատների առանցք՝
 բջիջների հանդիպման
 հաճախությունն՝
 արտահայտված տոկոսով:

Նկար 5 - Ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի բջիջների բաշխումն ըստ ԴՆԹ-ի պլոիդության ստուգիչ ում (ձախսյունակ) և ԽՆԺ-ի վիրուսի ազդեցությանը (աջսյունակ)

ՈԱԿ-ի Էրիթրոիդ բջիջների և նրանց կորիզների չափերը ստուգիչ ու մ և ԽՍԺ-ի վիրուսով վարակման դեպքում (մկմ²)

Բջիջներ	Ստուգիչ				ԽՍԺ վարակ		
	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ
պրոէրիթրոբլաստ	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±20.4**
խոչորբլաստ	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±9.8**
փոքրբլաստ	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±4.7
Բջջակորիզներ	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ
Պրոէրիթրոբլաստ	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±7.6
խոչորբլաստ	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±7.8
փոքրբլաստ	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±1.8

ԲՆԹ-ի պարունակությունը ՈԱԿ-ի բջիջներում (ընդհանուր) և բջջակորիզներում ԽՍԺ-ի վիրուսով վարակման դեպքում (պ/մ)

Բջիջներ	Ստուգիչ				ԽՍԺ վարակ			
	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ	96 ժվհ
Պրոէրիթրոբլաստ	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±1.2	-*
խոչորբլաստներ	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±2.4	5.4±0.5
փոքրբլաստներ	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	3.3±0.6
Բջջակորիզներ	24 ժ	48 ժ	72 ժ	96 ժ	24 ժվհ	48 ժվհ	72 ժվհ	96 ժվհ
պրոէրիթրոբլաստ	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	-*
խոչոր	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	2.8±0.3

բլաստներ								
փոքր բլաստներ	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***	2.0±0.2

* բջիջների աննշան քանակության պատճառով հաշվարկ չի կատարվել

ժվհ-ժամ վարակից հետո

** միտոլ մ ստուգիչի համեմատության ամբ (p<0.5)

***արժանահավատ է ստուգիչի համեմատության ամբ (p<0.05)

Ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի հիմնական բջիջների չափերի փոփոխությանն դիմամիկ հետազոտությունը կուլտիվացման չորս օրերի ընթացքում (աղ. 7) ցույց է տվել, որ ոսկրածուծի բջիջների նախորդ ձևերն ավելի խոշոր են, քան հասունները: Բջիջների մակերեսների փոփոխությանը համապատասխան փոխվում են նաև կորիզների մակերեսները: Վիրուսի ազդեցությամբ մեր կողմից բացահայտվել է պրոէրիթրոբլաստների չափերի մեծացում վարակի վաղ շրջանում:

ՌՆԹ-ի պարունակությունը բուր որ հետազոտված բջիջների ինչպես ցիտոպլազմայում, այնպես էլ կորիզում փոփոխվում է բջիջների չափերի փոփոխություններին համապատասխան: Վիրուսի ազդեցությամբ էական փոփոխություններ տեղի են ունենում վարակման սկզբնական փուլում (24ժ) պրոէրիթրոբլաստներում, երբ մեծանում է ՌՆԹ-ի պարունակությունը ինչպես կորիզում, այնպես էլ բջջում (աղ. 8): Այդուհանդերձ 8-ից հետևում է նաև, որ հսկվարակի ընթացքում ՌՆԹ-ի պարունակությունը նվազում է օքսիֆիլ էրիթրոբլաստներում ստուգիչ պարվիլացիայի համեմատությամբ:

Այս երևույթները բացատրելի հսկվ-ի վիրուսի վերարտադրությամբ անհնար է, քանի որ այն չի վերարտադրվում ուշ էրիթրոբլաստներում, համենայն դեպս, ոչ վարակի վաղ շրջանում: Մինչդեռ արժանահավատ փոփոխություններ տեղի են ունենում վարակման 48-72-րդ ժամերի ընթացքում: Ամենայն հավանականությամբ այս փոփոխությունները հանդիսանում են ՌԱԿ-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 էրիթրոբլաստների միջնորդաված ախտաբանական փոփոխությունների, մասնավորապես կորիզազրկման գործընթացներում (Chasis, Mohandas, 2008; McGrath, 2014):

ԵՆՐԱԿԱՏՈՒ ԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. ԽՍԺ-ի դիմամիկայում փայծաղում նշանակալիորեն ակտիվանում է էրիթրոպոեզը, ի հայտ են գալիս ոչ մեծ քանակությամբ պրոէրիթրոբլաստներ և էրիթրոիդ բջիջների ախտաբանական ձևեր, որոնք առողջ խոզերի փայծաղում բացակայում են:
2. ԽՍԺ-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. ԽՍԺ-ի սուր ձևի ընթացքում փայծաղի և ոսկրածուծի առաջնային կուլտուրայի էրիթրոիդ բջիջներում ԴՆԹ-ի

պարունակության վերլուծությունը բացահայտել է երիթրոիդ բջիջների կորիզների ըստ պոլիդության բաշխման հիստոգրամի տեղաշարժ դեպի աջ: Այդ գործընթացը սկսվում է հԱժ-ի սկզբնական փուլում և ավարտվում վարակման մոտավորապես 4-րդ օրը:

4. Առկա է նախաբորբոքային ցիտոկինների և հյուսվածքներում երկաթի պարունակության հակադարձ կորելյացիոն կախվածություն և հեմատոկրիտից:
5. *In vitro* պայմաններում հԱժ-ի վիրուսը անմիջական ազդեցություն և չի գործում երիթրոիդ բջիջների վրա:
6. Երիթրոնի ախտաբանությունը հԱժ-ի սուր ձևի դեպքում կարելի է բաժանել երկու մասի. երիթրոբլաստոզ, 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 երիթրոբլաստային կղզյակների կառուցվածքի և գործառնության խանգարման հետևանք, որը պայմանավորված է կղզյակների կենտրոնական մակրոֆագերի ախտահարմամբ:
8. հԱժ-ի սուր ձևի դեպքում հեմոլիզը հանդիսանում է վիրեմիայի ընթացքում ձերբագատվող իմունային միջնորդանյութերի (ցիտոկինների) ազդեցության հետևանք, որոնք հանգեցնում են բնորոշ համընդհանուր համակենսաբանական ախտաբանության:

ԱՏԵՆԱԽՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՏՊԱԳՐԿԱՆ 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 (գենոտիպ 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):1407-1414

Исследование патологических процессов внекостномозгового эритропоэза при африканской чумы свиней

Резюме

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 недостоверно 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 пloidности 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 репликацию вируса АЧС в ПККМ свиньи, популяционные показатели клеток эритроидного ряда не отличаются от контрольных, однако из-за сокращения численности лимфоидных клеток их относительное содержание возрастает. Содержание ДНК и РНК в эритроидных клетках ПККМ как в интактных так и в

инфицированных вирусом не демонстрируют существенной разницы. Все это говорит 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 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α) 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.

Misakyan Alla Edik

A study of pathological processes of extramedullary erythropoiesis during African swine fever

Summary

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 4th 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 2nd 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, we can assume that hemolysis in the acute form of ASF is a consequence of exposure immune mechanisms, particularly mediators (cytokines) released during viremia. In this aspect, we have shown an inverse correlation between the levels of cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) and the accumulation of iron in the liver tissue with the hematocrit which may be decided in favor of hemolytic character of blood pathology.

Thus, in the acute form ASF from the first days of infection develops erythroblastosis then hemolysis and hemorrhage, which are most pronounced on 4th to 7th 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 4th 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 read 'E. S. S.', is located in the lower right quadrant of the page.