ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՍԻՄՈՆՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ՆՈՐԱՅՐԻ

ԻՄՈՒՆԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ԱԽՏԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՈԶԵՐԻ ԱՖՐԻԿՅԱՆ ՍՈՒՐ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ԴԵՊՔՈՒՄ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

СИМОНЯН ЛУСИНЕ НОРАЙРОВНА

ПАТОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ОСТРОЙ ФОРМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН - 2016

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

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

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր Զ.Ռ. Տեր-Պողոսյան
բժշկ. գիտ. թեկնածու Ա.Ս. Գրիգորյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. ապրիլի 15-ին, ժամը 14:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում գործող Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդում (0014, Երևան, Հասրաթյան 7):

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

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

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

Научный руководитетль: доктор биол. наук Каралян З.А.

Официальные оппоненты: доктор биол. наук Тер-Погосян З.Р.
кандидат мед наук Григорян А.С.

Ведущая организация: Российско-Армянский (Славянский) университет

Защита диссертации состоится 15 апреля 2016г. в 14:00 часов на заседании специализированного совета 042 по экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте http://molbiol.sci.am.
Автореферат разослан 14 марта 2016г.

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

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Աշխատանքի արդիականությունը: Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտը (ԽԱԺ) կենդանիների առողջության պահպանության համաշխարհային կազմակերպությունը ներառել է «A» հիվանդությունների ցանկում՝ որպես բարձր մահացությամբ վարակիչ հիվանդություն: Այն տարածվում է արագ և անկախ աշխարհագրական սահմաններից: ԽԱԺ-ի բուժման և կանխարգելման բացակայությունը թողնում է ծանր սոցիալ-տնտեսական հետևանքներ [Sánchez-Vizcaíno et al., 2009]:

Չնայած այս հիվանդության այսչափ արդիականությանը, ԽԱԺ-ի ախտածագման մոլեկուլային մեխանիզմները դեռևս ամբողջովին պարզաբանված չեն: ԽԱԺ-ի ախտաբանության կարևոր հարցերից մեկը համարվում է իմունային համակարգի վիճակը, որի փոփոխությունների պատճառները, ցավոք, ևս պարզ չեն:

Հայտնի է, որ ցիտոկիններ սինթեզը կարևոր դեր ունի ԽԱԺ-ի ախտաբանությունում և չափազանց կարևոր է ԽԱԺ-ի վիրուսի վերարտադրության համար: Մոնոցիտ/մակրոֆագերն արտազատում են մի շարք լուծելի միջնորդանյութեր, ներառյալ նախաբորբոքային ցիտոկիններ [Murtaugh et al., 1996]: Ենթադրվում է, որ ՈՒՆԳ-α-ի (ուռուցքի նեկրոզի գործոն-α) մակարդակի բարձրացումը կարևոր դեր է խաղում ԽԱԺ-ի ախտածագման մեջ [Gómez del Moral et al., 1999]: Չնայած այս ամենին, ԽԱԺ-ի ախտաբանությունում քիչ է ուսումնասիրված ինտերլեյկինների դերը և նախաբորբոքային ցիտոկինների արտադրությունը հիվանդության դինամիկայում: Ինչպես նաև դեռևս ուսումնասիրված չէ այս ցիտոկինների արտադրության և իմունային համակարգի ծայրամասային օրգանների (ավշային հանգույցներ, փայծաղ) բջջային կազմի փոփոխությունների միջև ընկած փոխադարձ կորելացիոն կապը:

Նպատակը և խնդիրները: Հետազոտության նպատակն է սուր ԽԱԺ-ի դեպքում ուսումնասիել իմունային համակարգի ծայրամասային օրգաններում՝ ավշային հանգույցներում և փայծաղում լիմֆոցիտների և նրանց նախորդների՝ լիմֆոբլաստների մորֆոֆիզիոլոգիական փոփոխությունները: Ստացված արդյուքները համադրել ծայրամասային արյան հետազոտությունների համապատասխան արդյունքների հետ: Ինչպես նաև հիվանդության ընթացքում հայտնաբերել նախաբորբոքային ցիտոկինների քանակական փոփոխությունները խոզերի ծայրամասային արյան մեջ:

Նշված նպատակի իրականացման համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները՝

- Ուսումնասիրել խոզերի ավշային հանգույցները և փայծաղը նորմալ և ախտաբանական վիճակներում: ԽԱԺ-ի դինամիկայում կատարել հերձումներ և ճշտել իմունային համակարգի ծայրամասային օրգանների ախտաանատոմիական և հյուսվածաբանական փոփոխությունները:
- ԽԱԺ-ի դինամիկայում ուսումնասիրել իմունային համակարգի ծայրամասային օրգանների լիմֆոիդ բջիջների պոպուլյացիայում քանակական փոփոխությունները: Լիմֆոիդ պոպուլյացիայի ստացված արդյունքները համադրել ծայրամասային արյան լեյկոցիտային կազմի փոփոխությունների հետ:

- ԽԱԺ-ի դինամիկայում ուսումնասիրել հիմնական նախաբորբոքային ցիտոկինների՝ ԻԼ-1β-ի, ԻԼ-6-ի, ԻԼ-8-ի և ՈՒՆԳ-α-ի մակարդակների փոփոխությունը ծայրամասային արյան մեջ:

Գիտական նորույթը: Ուսումնասիրվել է խոզերի ավշային հանգույցներում և փայծաղում լեյկոցիտների պոպուլյացիոն կազմի փոփոխությունը հիվանդության ողջ ընթացքում: Առաջին անգամ ներկայացվել է ամբողջական լիմֆոգրամ ԽԱԺ-ի դեպքում, ինչպես նաև փայծաղի պարենքիմայում լիմֆոիդ բջիջների պոպուլյացիայում քանակական փոփոխությունները:

Իրականացվել է ավշային հանգույցներում լիմֆոիդ բջիջների քանակական փոփոխությունների արդյունքների համադրում ծայրամասային արյան լեյկոցիտների քանակական փոփոխությունների հետ: Ուսումնասիրվել է խոզերի ավշային հանգույցների և փայծաղի լիմֆոցիտներում և լիմֆոբլաստներում ԴՆԹ-ի պարունակության բջջասպեկտրոֆոտոմետրիկ ցուցանիշների փոփոխությունները հիվանդության դինամիկայում:

Հիվանդության դինամիկայում ուսումնասիրվել է ԽԱԺ-ի ախտածագման մեջ կարևոր նշանակություն ունեցող նախաբորբոքային ցիտոկինների քանակական տեղաշարժերն առողջ և վարակված խոզերի ծայրամասային արյան մեջ: Սուր ԽԱԺ-ի ընթացքում մեր կողմից առաջին անգամ ուսումնասիրվել է ԻԼ-8-ի մակարդակի փոփոխությունը:

Գիտակիրառական նշանակությունը: Հաշվի առնելով ԽԱԺ-ի կանխարգելման և բուժման միջոցառումների բացակայությունը, որոնք հանդիսանում են արդիական խնդիր, մեր հետազոտությունների արդյունքները նոր հնարավորություններ կընձեռնեն ԽԱԺ-ի կանխարգելման և բուժման համար: Արդյունքներն օգտակար կլինեն նաև ԽԱԺ-ի վիրուսի նկատմամբ արդյունավետ հակավիրուսային դեղամիջոցների և պատվաստանյութերի մշակման համար:

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

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

Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը շարադրված է 110 էջի վրա, պարունակում է 4 աղյուսակ, 30 նկար, որից 16-ը գծապատկերներ են: Գրականության ցանկը ներառում է անգլերեն ու ռուսերեն լեզուներով 162 անվանում: Ատենախոսությունը բաղկացած է հապավումների ցանկից, ներածությունից, գրական ակնարկից, փորձարարական մասից, հետազոտության արդյունքներից, արդյունքների քննարկումից, եզրակացություններից ու գրականության ցանկից:

ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Կենդանիներ: Փորձերում օգտագործվել են 3-4 ամսեկան, 35-40 կգ զանգվածով 21 խոզ, որից 17-ը վարակվել են ԽԱԺՎ-ի միջմկանային ներարկման ճանապարհով, իսկ 4-ը՝ ընդգրկվել ստուգիչ խմբում: Կենդանիների խնամքը և էֆթանազիան իրականացվել է համաձայն կենդանիների խնամքի ու կիրառման (ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի ներինստիտուտային վերահսկող

խորհրդի/Էթիկայի անկախ կոմիտե, IRB#00004079) և ամերիկյան անասանաբույժների բժշկական ասոցիացիայի էֆթանազիայի մասին ուղեցույցների: Ուսումնասիրություններն իրականացվել են խոզերի ավշային հանգույցների և փայծաղի պատճենների, կտրվածքների ու ծայրամասային արյան քսուկների օգնությամբ: Քսուկների պատրաստման, վիրուսի տիտրի որոշման և արյան շիճուկում ցիտոկինների քանակական հաշվարկի համար ծայրամասային արյունը հավաքվել է խոզերի ակնային երակային ծոցից [Stier and Leucht, 1980]: Հիվանդության 7 օրերի ընթացքում յուրաքանչյուր օր պատրաստվել են արյան քսուկներ: Հավաքվել է նաև 3-4մլ արյուն ցիտոկինների քանակական ուսումնասիրությունների համար: Ավշային հանգույցները և փայծաղը վերցվել են խոզերին վարակելուց հետո յուրաքանչյուր օր իրականացվող խոզերի հերձման ընթացքում: Ավշային հանգույցներից և փայծաղից պատրաստվել են կտրվածքներ (ներկվել են հոմատոքսիլին-էոզինով) և պատճեններ (ներկվել են ըստ Գիեմզայի):

Վիրուս: Հետազոտություններում օգտագործվել է ԽԱԺ-ի գենոտիպ II վիրուսը: ԽԱԺՎ-ի տիտրը որոշվել է հեմադսորբցիայի եղանակով [Enjuanes et al., 1976, Wardley and Wilkinson, 1980]: Փորձարարական ճանապարհով վարակման համար ԽԱԺՎ-ի չափաբաժինը կազմել է 10^4 հեմադսորբցիոն միավոր՝ $HADU_{50}$/մլ 0,2 մլ/կգ-ի հաշվարկով:

Բջիջների մորֆոլոգիական վերլուծություն: Խոզերի ծայրամասային արյան և ավշային հանգույցներում, փայծաղում լիմֆոցիտների և նրանց նախորդների մորֆոլոգիական վերլուծությունն իրականացվել է բջիջների ֆիքսված քսուկների և պատճենների օգնությամբ, որոնք ներկվել են հեմատոքսիլին-էոզինով ըստ Ռոմանովսկի-Գիեմզայի [Ромейс, 1954]: Բջիջների մորֆոլոգիական ուսումնասիրությունները կատարվել են ըստ Weiss-ի ու Wardrop –ի (2010) և Harvey-ի (2012):

ԴՆԹ-ի ներկում ըստ Ֆյոլգենի: ԴՆԹ-ի բջջաֆոտոմետրիա: Ցիտոքիմիական հետազոտությունների համար պատրաստուկները ներկվել Շիֆֆի ռեակտիվով ըստ Ֆյոլգենի:

Ուսումնասիրվող լիմֆոիդ բջիջների բոլոր ձևերում ԴՆԹ-ի քանակի որոշումը ստուգիչ և ԽԱԺՎ-ով ախտահարված ծայրամասային արյան ներկված քսուկներում և ավշային հանգույցների ու փայծաղի պատճեններում իրականացվել է հեռուստատեսային ուղիղ բջջասպեկտրոֆոտոմետրիայի մեթոդով (ԴՆԹ-ֆուքսին համալիրի կողմից ալիքի առավելագույն կլանման տիրույթը մանրադիտակ-ֆոտոմետրի համար կազմել է 575նմ): Կորիզներում ԴՆԹ-ի քանակության ստացված տվյալների հիման վրա կառուցվել են հիստոգրամներ ըստ պլոիդության դասերի: Հիստոգրամների կառուցման համար առողջ խոզերի ծայամասային արյան լիմֆոցիտների կորիզներում որոշվել է ԴՆԹ-ի պլոիդային ստանդարտը:

Սպիտակուցների նաֆթոլ դեղին ներկում: Բջջում ընդհանուր սպիտակուցների քանակական որոշման համար բոլոր պատրաստուկները ներկվել են Ֆյոլգենը նաֆթոլ դեղինին համակցելու մեթոդով [Gaub et al., 1975]: Սպիտակուցների քանակական ուսումնասիրությունն իրականացվել է մանրադիտակ ֆոտոմետրի միջոցով 434նմ ալիքի տիրույթում:

Ցիտոկինների մակարդակի որոշում ծայրամասային արյան շիճուկում: Ցիտոկինների քանակական հետազոտությունները կատարվել են 4 առողջ և ԽԱԺՎ-ով վարակված 8 խոզերի ծայրամասային արյան շիճուկներում: Խոզերի արյան

շիճուկներում ցիտոկինների հանդեպ IgG հակամարմիններն որոշվել են ELISA մեթոդով՝հիմնված դասական կարծրֆազային իմունոֆերմենտային եղանակի վրա:

Համակարգչային վերլուծություն: Պատրաստուկների ուսումնասիրության համար կիրառվել է լուսային մանրադիտակ (REFLECTED LIGHT FLUORESCENCE MICROSCOPE L2001 Series User Guide), իսկ վերլուծությաունն իրականացվել է Labkit Standart v1.1en ծրագրի օգնությամբ:

Վիճակագրական վերլուծություն: Ստացված փորձարարական բոլոր տվյալները ենթարկվել են վերլուծության, մշակվել են վարիացոն վիճակագրության մեթոդներով, որտող վիճակագրական վերլուծության համար կիրառվել է "Excel" ծրագրային փաթեթի 13.0 տարբերակի "Տվյալների վերլուծության" բաժնի "Նկարագրական վերլուծության" ենթաբաժինը: Պարամետրիկ ցուցանիշների համար տարբերության հավաստիության որոշումը կատարվել է ըստ Ստյուդենտի t չափանիշի: Ոչ պարամետրիկ ցուցանիշների համար տարբերության հավաստիության որոշումը կատարվել ըստ Վիլկոքսոն-Մանն-Ուիթնիի U չափանիշի SPSS 13.0 ծրագրի օգնությամբ (SPSS, Inc., Chicago, IL):

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄՆԵՐ

Խոզերի փորձարարական վարակումը ԽԱԺՎ-ով: Կլինիկական և ախտաանատոմիական հետազոտություններ

Մեր կողմից իրականացված փորձարարական վարակման ընթացքը ոչնչով չի տարբերվել գրականության մեջ նկարագրված հիվանդության ընթացքից և 6-րդ կամ 7-8-րդ ՀՎՕ-ին(հետվարակային օր) հասել է ագոնալ փուլին: Վարակումից հետո հիվանդության առաջին 2 օրերը ընթացել են առանց որևէ ախտանշանների, չնայած 2-րդ հետվարակային օրից սկսած գրանցվել է վիրեմիա (մինչև log 4-5 HADU/մլ): Այնուհետև, հիվանդության 3-4-րդ օրերից նկատվել է ախաորժակի բացակայություն, որը զուգորդվել է մարմնի արտաքին ծածկույթների ջերմաստիճանի բարձրացմամբ՝ մինչև 40-41°C, ակտիվության նվազմամբ, շնչառության դժվարեցմամբ: 5-6-րդ օրերեն որոշ կենդանիների արտաթորանքում նկատվել է արյուն: 2-3-րդ ՀՎՕ-ից սկսած մաշկային ծածկույթում նկատվել են արյունազեղումներ: Դիտվել են նաև վարքային փոփոխություններ՝ կենդանիները հաճախ պառկած էին ստվերում, շնչառությունը հաճախացած էր, դրսևորում էին արտահայտված անտարբերություն:

Խոզերի հերձման ժամանակ հայտնաբերվել են բազմաթիվ արյունազեղումներ լորձաթաղանթներում և շճաթաղանթներում, ինչպես նաև որովայնի և կրծքի խոռոչների օրգաններում: Ավշային հանգույցները մեծացած էին՝ներսփռված արյունազեղումներով: Ընդերային ավշային հանգույցները մեծացած էին, շոշափելիս փափուկ և ունեին արտաքնապես հեմատոմաներ հիշեցնող մուգ բալագույն, կապույտ երանգ: Փայծաղը ծավալով մեծացած էր, կակղանը փափկած էր, փխրուն, ուներ մուգ կարմիր երանգ և լցված էր արյունով:

Ավշային հանգույցների ախտաբանությունը

Մարմնական և էնդերային ավշային հանգույցների ախտաանատոմիական հետազոտություններում հայտնաբերված փոփոխություններն սկզբում բնութագրվում են սերոզ, ապա սերոզ-հեմորագիկ և հեմորագիկ լիմֆադենիտով:

3-րդ ՀՎՕ-ում ավշային հանգույցների մանրադիտակային հետազոտությունների արդյունքում արդեն հայտնաբերվում են ախտաբանական փոփոխություններ: Առաջնային ախտաբանական փոփոխությունները բնութագրվում են էրիթրոցիտների ներթափացման և պարենքիմային բջիջների նվազման պատկերով, որտեղ ավելացել էր ախտահարված և քայքայված բջիջների թիվը:

Այսպիսով, ցույց է տրված, որ սուր ԽԱԺ-ի ամենավաղ փուլերից սկսած (2-3-րդ օր) առաջանում են ավշային հանգույցների ախտահարումներ՝ կետային, իսկ հետագայում զանգվածային արյունազեղումների տեսքով: Նկարագրվել է նաև ավշային ֆոլիկուլների հիպերպլազիա, որն ավելի ուշ փուլերում լիմֆոիդ բջիջների արտամղման հետևանքով փոխարինվել է հիպոպլազիայով:

Լիմֆոգրամ

Մեր հետազոտություններում ներկայացվում են սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում ավշային հանգույցներում տեղի ունեցող փոփոխությունները: Լիմֆոիդ օրգաններում այդ կարևորագույն փոփոխություններից մեկը հանդիսանում է ավշային հանգույցների բջջային պոպուլյացիայի կազմի փոփոխությունը՝ լիմֆոգրամը: ԽԱԺ-ի դեպքում խոզերի ամբողջական լիմֆոգրամն առաջին անգամ ուսումնասիրվել և ներկայացվել է մեր կողմից [Zakaryan et al., 2015]: Ավշային հանգույցում բջջային պոպուլյացիայի կազմը ներկայացնող տվյալները բերվում են աղյուսակ 1-ում:

Ինչպես երևում է աղյուսակ 1-ից առողջ խոզերի ավշային հանգույցների բջջային պոպուլյացիայի ամենահիմնական բջիջները լիմֆոցիտներն են, որոնք լիմֆոբլաստների հետ միասին կազմում են ողջ կորիզավոր բջիջների մոտ 85%-ը: Կորիզավոր բջիջների 11.5%-ը կազմում են միոլոիդ շարքի բջիջները: Բջիջների մոնոցիտային շարքը կազմում է 2%-ը, իսկ կորիզավոր էրիթրոիդ բջիջները՝ 1.5%-ից էլ քիչ:

ԽԱԺ-ի զարգացման վաղ փուլերում լիմֆոցիտների քանակն ավելանում է (ոչ արժանահավատ), իսկ փորձարարական վարակման 5-րդ օրից սկսած մինչև վերջին օրը՝ նվազում: Հիվանդության 6-7-րդ օրերին լիմֆոցիտների քանակությունը 2 անգամ արժանահավատ նվազում է ստուգիչ խմբի ցուցանիշների համեմատ: Ավշային հանգույցների բջջային պոպուլյացիայում վարակի 3-րդ օրից սկսած հայտնաբերվում են ատիպիկ լիմֆոցիտներ: ԽԱԺ-ի ժամանակ ատիպիկ լիմֆոցիտնեն առաջին անգամ հայտնաբերվել են բջջի կենսաբանության և վիրուսաբանության լաբորատորիայում տարվող հետազոտությունների արդյունքում [Karalova et al., 2011b, Karalyan et al., 2012b]: Մինչև հիվանդության վերջին օրն այդ ատիպիկ լիմֆոցիտները հայտնաբերվում են, այն էլ աճող քանակություններով: Հիվանդության վաղ փուլերում բջջային պոպուլյացիայում նկատվում է լիմֆոբլաստների նվազման միտում: Հիվանդության ողջ ընթացքում բազոֆիլների պոպուլյացիան մնում է գրեթե անփոփոխ: Նեյտրոֆիլներին բնորոշ է պոպուլյացիայի երիտասարդացումը (վարակի 5-րդ օրից սկսած), որտեղ դիտվում է

ցուպիկակորիզավոր բջիջների ավելացում, ի տարբերություն սեգմենտակորիզավոր նեյտրոֆիլների կայուն ցուցանիշների:

Աղյուսակ 1.

Խոզի ավշային հանգույցի բջջային կազմը ստուգիչ խմբում և ԽԱԺ-ի դինամիկայում

Բջիջներ	Ստու-գիչ	2-րդ ՀՎՕ	3-րդ ՀՎՕ	4-րդ ՀՎՕ	5-րդ ՀՎՕ	6-րդ ՀՎՕ	7-րդ ՀՎՕ
Մոնոցիտ	1.1±0.3	0.3±0.05	0.2±0.01	0.7±0.2	2.3±0.7	1.6±0.6	5.0±1.3**
Մոնոբլաստ	0.9±0.2	0.1±0.01	0.1±0.01	0.4±0.1	1.1±0.3	0.8±0.2	0.2±0.08
Լիմֆոցիտ	83.0±6.4	91.1±8.3	90.5±5.8	92.7±10.3	67.0±7.5	37.0±9.6*	42.6±5.8*
Ատիպիկ լիմֆոցիտ	-	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.3±0.1**	0.5±0.2**	0.8±0.2**
Լիմֆոբլաստ	1.9±0.4	0.5±0.1***	0.5±0.1***	0.3±0.02***	1.0±0.2	2.2±0.7	1.0±0.4
Միելոիդ բջիջներ	4.3±1.1	4.0±0.9	3.7±0.7	2.4±0.7	3.4±0.6	10.6±1.6**	18.5±1.4**
Մետամիելո-ցիտ	2.5±0.9	0.5±0.1*	0.5±0.1*	0.3±0.07*	2.6±0.9	2.7±0.7	3.8±0.8
Ցուպիկ. նեյտրոֆիլ	1.2±0.4	0.5±0.2	1.5±0.3	0.3±0.08***	3.4±1.4***	4.9±1.6**	3.9±1.1***
Սեգմենտ. նեյտրոֆիլ	0.8±0.1	0.8±0.2	1.0±0.2	0.2±0.01	1.0±0.3	1.2±0.3	1.2±0.4
Մետամիելո-ցիտէոզինոֆիլ	0.7±0.1	0.5±0.1	0.5±0.2	0.1±0.01	4.3±1.2**	8.4±0.7**	0.4±0.1
Էոզինոֆիլ	1.5±0.3	1.0±0.2	1.0±0.3	1.6±0.3	3.1±0.9	11.8±2.9**	1.6±0.5
Բազոֆիլ	0.5±0.1	0.3±0.05	0.1±0.02	0.2±0.01	0.4±0.1	1.1±0.4	0.2±0.06
Կորիզավոր էրիթրոիդներ	1.4±0.1	0.5±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	10.1±2.4**	17.0±3.0**	20.7±3.4**

* արժանահավատ փոքր է ստուգիչ խմբից ($p<0.05$-$p<0.01$)

** արժանահավատ մեծ է ստուգիչ խմբից ($p<0.05$-$p<0.01$)

*** միտում ($p<0.1$)

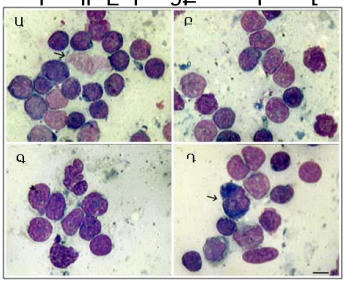
Գրեթե միաժամանակ (վարակի 6-րդ օրից սկսած) կտրուկ ավելանում է նեյտրոֆիլների ամենավաղ մորֆոլոգիապես ճանաչելի նախորդների՝ միելոիդ բջիջների քանակությունը: Սա անկասկած նշան է հանդիսանում պոպուլյացիայի երիտասարդացման (վերականգնողական տեղաշարժ), որը բնորոշ է ԽԱԺ-ի որոշ ձևերին [Gómez-Villamandos et al., 1997b]: Նմանատիպ գործընթացներ տեղի են ունենում նաև էոզինոֆիլների պոպուլյացիայում, սակայն այստեղ ավելանում է հասուն ձևերի քանակությունը: Սա պայմանավորված է ինչպես հասուն էոզինոֆիլների ցածր զգայնությամբ ԽԱԺ-ի վիրուսի նկատմամբ, այնպես էլ վերականգնողական տեղաշարժով, որը հավանաբար բնորոշ է ողջ միելոիդ պոպուլյացիային: Էիրթրոիդ շարքի կորիզավոր բջիջների պոպուլյացիան վարակի 5-րդ օրից սկսած արժանահավատորոն ավելանում է: Նրա մասնաբաժինը ավշային հանգույցի ողջ բջջային պոպուլյացիայի մեջ աճում է ավելի քան 10 անգամ: Այս աճը տեղի է ունեում ի հաշիվ ավշային հանգույցի հիմնական բջիջների՝ լիմֆոցիտների

քանակի նվազման, ինչպես նաև էիրթրոպոեզի խանգարման, մասնավորապես, էիրթրոցիտների հասունացման խանգարման [Karalova et al., 2014]: Այս ամենի հետ միաժամանակ հետվարակային 6-7-րդ օրերին (հիվանդության վերջնական փուլ) տեղի է ունենում միելոիդ բջիջների քանակության զգալի աճ:

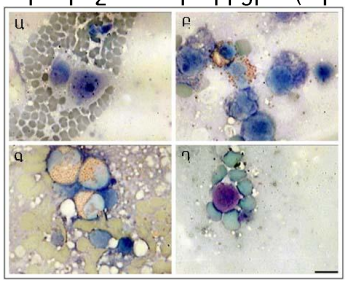
Ավշային հանգույցներում բջիջների պոպուլյացիոն կազմի փոփոխությունների հետ միաժամանակ տեղ է ունենում նաև բջիջների կենսունակության և նրանց ընդհանուր քանակության փոփոխություններ: Հետվարակային 2-րդ օրից սկսած գրանցվում է ոչ կենսունակ բջիջների քանակական աճ (տարբերությունը ստուգիչ խմբի հետ արժանահավատ է սկսած 3-րդ օրից մինչև փորձի ավարտը $p<0.01$-$p<0.001$): Վարակից 3 օր անց անկենսունակ բջիջները կազմում են ընդհանուր պոպուլյացիայի 10%-ը:

Առողջ խոզերի ավշային հանգույցների պատճենների ուսումնասիրության արդյունքում պարզ երևում է, որ ավշային հանգույցի բջջային պոպուլյացիայի հիմնական բջիջները լիմֆոցիտներն են: Այդ պոպուլյացիայում քիչ թվով, բայց հանդիպում են նաև լիմֆոբլաստներ, միելոիդ բջիջներ և էրիթրոիդ բջիջներ (նկար 1):

ԽԱԺ-ի դինամիկայում ավշային հանգույցների պատճենների ուսումնասիրությունների արդյունքում գրանցվել է հասուն լիմֆոցիտների թվաքանակի նվազում՝ լիմֆոպենիա (մոտավորապես 2 անգամ): Հիվանդության ընթացքում զարգացող լիմֆոպենիային զուգահեռ ավելանում է էոզինոֆիլների թիվը: Վարակի ընթացքում նկատվում է ԽԱԺ-ին բնորոշ հեմադսորբցիա (նկար 2):



Նկար 1 - Առողջ խոզ:



Նկար 2 – ԽԱԺ-ի դինամիկա:

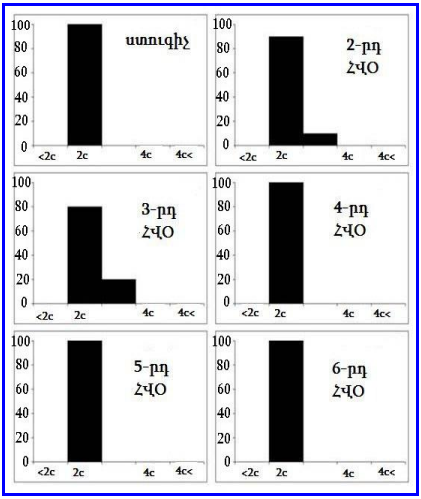
Պատճենները ներկվել են ըստ Գիեմզայի, մասշտաբը՝ 10 մկմ:

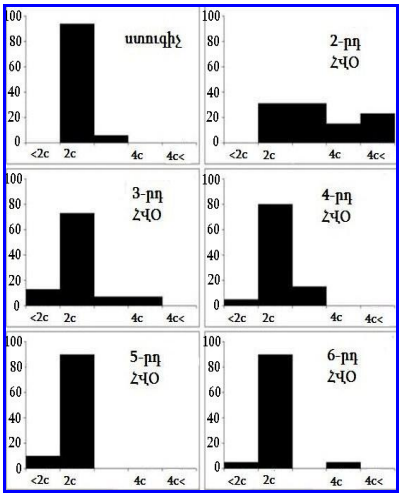
Ավշային հանգույցի լիմֆոցիտների և լիմֆոբլաստների կորիզային ԴՆԹ-ի, սպիտակուցների քանակական փոփոխությունները:
Բջիջների մորֆոլոգիական հետազոտություն

Մեր աշխատանքի հաջորդ փուլում ուսումնասիրել ենք լիմֆոցիտների և լիմֆոբլաստների բջջաբանական և մորֆոֆունկցիոնալ հատկությունները՝ կիրառելով բջջասպեկտրոֆոտոմետրիայի մեթոդը: Այդ բջիջների կորիզներում ԴՆԹ-ի քանակության վերաբերյալ ստացված տվյալների հիման վրա կառուցվել են հիստոգրամներ ըստ պլոիդության դասերի: Ինչպես երևում է նկար 3-ում առողջ խոզերի ավշային հանգույցների լիմֆոցիտները դիպլոիդ են: ԽԱԺ-ի վաղ փուլերում լիմֆոցիտների պոպուլյացիայում հայտնվում են հիպերդիպլոիդ բջիջներ, ինչը

համապատասխանում է միտոտիկ ցիկլի S փուլին: Հիպերդիպլոիդ լիմֆոցիտների հայտնվելու պատճառ կարող է հանդիսանալ ինչպես օրգանիզմի ռեակցիան վիրեմիայի նկատմամբ (որը գրանցվում է արդեն վարակից 24-48 ժամ անց), այնպես էլ ԽԱԺ-ի վիրուսի ուղղակի ազդեցությունը, որն առաջ է բերում ախտահարված բջիջների կորիզային ԴՆԹ-ի պրոլիֆերացիա [Enjuanes et al., 1977, Nascimento et al., 2012]: Լիմֆոցիտներում ԴՆԹ-ի քանակության ավելացումը, որը տեղի չի ունեցել քաղցկեղային տրանսֆորմացիայի հետևանքով, հիմնականում կապում են նրանց ակտիվության բարձրացման հետ՝ խթանված տարբեր գործոններով, այդ թվում նաև համակարգային բորբոքումով [Olivares-Zavaleta et al., 2011, Wang et al., 2011]:

Նկար 4-ում երևում է, որ ավշային հանգույցում լիմֆոբլաստները հիմնականում դիպլոիդ են, սակայն բջիջների ընդհանուր պոպուլյացիայում հայտնաբերվում են նաև հիպերդիպլոիդ լիմֆոբլաստներ: ԽԱԺ-ի վաղ փուլերում՝ 2-րդ ՀՎՕ, լիմֆոբլաստների պոպուլյացիայում հայտնվում են արդեն հիպերդիպլոիդ, տետրապլոիդ, հիպերտետրապլոիդ լիմֆոբլաստներ. գրանցվում է հիստոգրամի տեղաշարժ դեպի աջ, ինչը վկայում է այդ բջիջների կորիզային ԴՆԹ-ի պրոլիֆերացիայի մասին: ԽԱԺ-ի դինամիկայում արդեն 3-րդ ՀՎՕ-ից սկսած բջիջների պոպուլյացիայում հայտնաբերվում են հիպոդիպլոիդ լիմֆոբլաստներ. հիստոգրամը տեղաշարժվում է դեպի ձախ (3-6-րդ ՀՎՕ): Հիպոդիպլոիդ լիմֆոբլաստների առկայությունը վկայում է ապոպթոզային գործընթացների մասին:

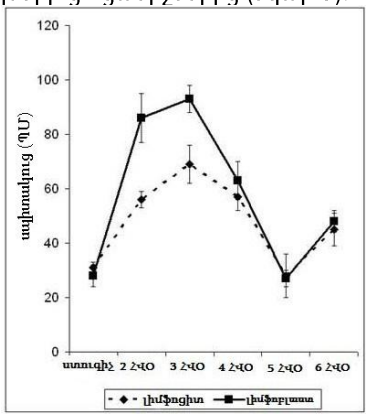




Նկար 3 – Լիմֆոցիտներ: **Նկար 4** – Լիմֆոբլաստներ:
Կորիզների բաշխումը ըստ ԴՆԹ-ի պլոիդության դասերի:
Աբցիսների առանցք՝ պլոիդության դասերը ըստ ԴՆԹ-ի պարունակության,
Օրդինատների առանցք՝ ընդհանուր պոպուլյացիայում բջիջների պարունակությունը %-ով:

Հիվանդության 2-4-րդ ՀՎՕ-ն ներառյալ ավշային հանգույցների լիմֆոցիտներում և լիմֆոբլաստներում տեղի է ունեում սպիտակուցի պարունակության արժանահավատ բարձրացում: Հիվանդության ավելի ուշ փուլերում հետազատված

բջիջներում սպիտակուցի պարունակության ցուցանիշները չեն տարբերվել ստուգիչ խմբի ցուցանիշներից (նկար 5):



Լիմֆոցիտներում սպիտակուցների քանակության ավելացումը սովորաբար կապում են այդ բջիջների ակտիվացման հետ՝ խթանված ինչպես յուրահատուկ, այնպես էլ ոչ յուրահատուկ խթանիչներով: Տարբեր վիրուսների ազդեցությամբ լիմֆոցիտների ակտիվացման փաստը հայտնի է վաղուց:

Նկար 5 - Ավշային հանգույցների լիմֆոցիտներում և լիմֆոբլաստներում սպիտակուցի պարունակությունը: Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր, Օրդինատների առանցք՝ սպիտակուցի պարունակությունը պայմանական միավորներով (ՊՄ):

Լիմֆոցիտների ակտիվացումը հնարավոր է ինչպես վիրուսով վարակվելու և վիրուսի բազմացման արդյունքում, այնպես էլ համապատասխան բջիջների աբորտիվ (ոչ արդյունավետ) վարակի հետևանքով: Կարևոր է նշել, որ խոզի լիմֆոցիտներն զգայուն են ԽԱԺ-ի վիրուսի բազմացման նկատմամաբ և նրանց ակտիվացումը հնարավոր է վերոնշյալ փոխազդեցությունների հետևանքով [Wardley et al., 1977]:

Իմուն համակարգի բջիջների մակերեսների փոփոխությունները հանդիսանում են ֆիզիոլոգիական կարգավիճակի կարևոր ցուցանիշներ: ԽԱԺ-ի դինամիկայում ավշային հանգույցների լիմֆոիդ բջիջների մակերեսների ուսումնասիրությունների արդյունքները բերվում են աղյուսակ 2-ում:

Աղյուսակ 2.

Ավշային հանգույցի լիմֆոիդ բջիջների մակերեսները ԽԱԺ-ի դինամիկայում (մկմ^2)

Բջիջներ	ստուգիչ	2-րդ ՀՎՕ	3-րդ ՀՎՕ	4-րդ ՀՎՕ	5-րդ ՀՎՕ	6-րդ ՀՎՕ
Լիմֆոցիտ	82.5±10.1	128.6±13.2*	134.3±27.0**	134.6±30.2**	115.3±18.4	131.9±19.7*
Լիմֆոբլաստ	94.2±14.7	147.1±26.1**	142.5±25.2	137.4±19.8**	129.6±25.1	140.7±21.2**

*արժանահավատ է ստուգիչի համեմատ ($p<0.05$)

** միտում ստուգիչի համեմատ ($p<0.1$)

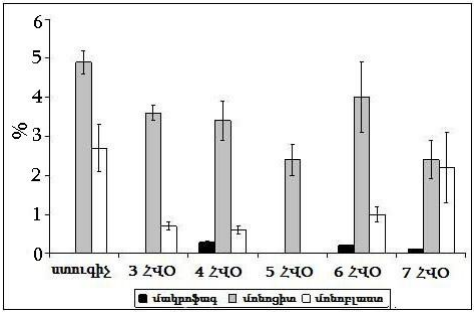
Ինչպես հետևում է աղյուսակից, հիվանդության համարյա բոլոր օրերին ավշային հանգույցներում հայտնաբերվել է լիմֆոցիտների և լիմֆոբլաստների մակերեսների արժանահավատ մեծացում կամ միտում ինտակտ կենդանիների համեմատ: Մեծ քանակության ցիտոպլազմա պարունակող լիմֆոցիտների թվի ավելացումն արտացոլում է բորբոքումների ժամանակ նրանց արդեն լավ հայտնի գործառույթների ակտիվացումը:

Խոզի փայծաղի լիմֆոիդ պոպուլյացիան սուր ԽԱԺ-ի դեպքում

Քանի որ փայծաղում իմունային բջիջների կարևոր բաղադրիչ մասը կազմում է մոնոցիտ/մակրոֆագային համակարգը, այդ իսկ պատճառով նկար 6-ում ցույց է տրվում սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում մոնոցիտ/մակրոֆագային պոպուլյացիայի փոփոխությունները խոզի փայծաղում: Ինչպես երևում է նկարից այս կարևորագույն

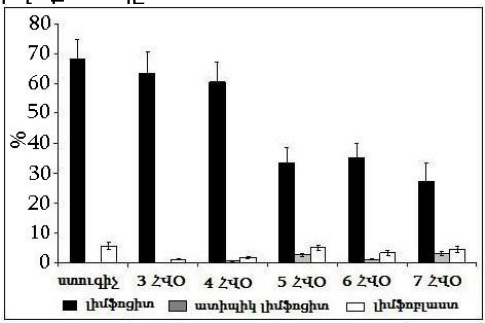
փոփոխությունների մասն է կազմում հասուն, իսկ հաճախ նաև ակտիվացած մակրոֆագերի ոչ մեծ պոպուլյացիայի հայտնվելը հիվանդության 4-7-րդ օրերեն: Առողջ խոզերի փայծաղի պատճեններում մեր կողմից մակրոֆագեր չեն հայտնաբերվել:

Մոնոցիտների պոպուլյացիան հիվանդության 5-րդ և 7-րդ օրերին ունի նվազման միտում ($p<0.1$): Հիվանդության 3-5-րդ օրերեն գրանցվում է մոնոբլաստների քանակության արժանահավատ նվազում ($p<0.05$):



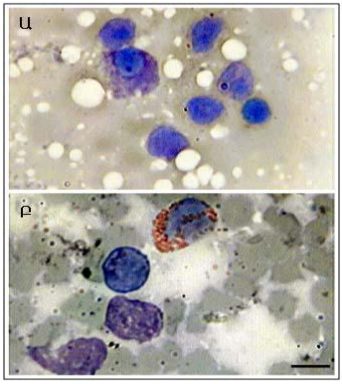
Նկար 6 - Խոզի փայծաղում մոնոցիտ/մակրոֆագային պոպուլյացիայի փոփոխությունները:
Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր,
Օրդինատների առանցք՝ բջիջների քանակությունն արտահայտված %-ով:

Նկար 7-ում պարզ երևում է, որ սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում խոզի փայծաղում տեղի է ունենում հասուն լիմֆոցիտների քանակության ընդգծված նվազում: Առողջ խոզերի համեմատ հիվանդության 5-7-րդ օրերեին հիվանդ խոզերի մոտ մոտավորապես երկու անգամ նվազում է լիմֆոցիտների պոպուլյացիան: Մյուս կարևորագույն փոփոխությունը դա հիվանդության 4-րդ օրը լիմֆոիդ պոպուլյացիայում ատիպիկ լիմֆոցիտների հայտնվելն է: Այս փոփոխությունները դառնում են արժանահավատ հիվանդության 5-րդ օրից սկսած: ԽԱԺ-ի վաղ փուլերում (3-4-րդ օրեր) լիմֆոբլաստների քանակությունը նվազում է, իսկ հիվանդության վերջնական փուլում և գագաթնակետում վերականգնվում է նրանց թվաքանակը:



Նկար 7 - Խոզի փայծաղում լիմֆոիդ պոպուլյացիայի փոփոխությունները ստուգիչ խմբում և սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում:
Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր,
Օրդինատների առանցք՝ բջիջների քանակությունն արտահայտված %-ով:
*Հաշվարկվել են բոլոր կորիզավոր բջիջները:

Նկար 8-ում ներկայացվում են առողջ և ԽԱԺ-ի վերջնական փուլում գտնվող խոզերի փայծաղների պատճենները, որտեղ նույնպես նկատելի է լինֆոպենիայի զարգացումը:



Նկար 8 - Փայծաղի պատճեններ:
Ա – Առողջ խոզ - 5 փոքր լիմֆոցիտ, 1 նեյտրոֆիլ և 1 լիմֆոբլաստ:
Բ – Հիվանդության 6-րդ օր - վերից վար՝ էոզինոֆիլ, էրիթրոբլաստ, 2 լիմֆոցիտ (ներքևում տեսանելի է քայքայված լիմֆոցիտ):
Պատճենները ներկված են ըստ Գիեմզայի, մասշտաբը՝ 10 մկմ:

Հաշվի առնելով սուր ԽԱԺ-ի դեպքում լիմֆոպենիայի առկայությունը [Karalyan et al., 2012b], կարող ենք եզրակացնել, որ իմունային համակարգի ծայրամասային բոլոր օրգաններում և հյուսվածքներում տեղի են ունենում լիմֆոիդ պոպուլյացիայի համկարգային փոփոխություններ: Սուր ԽԱԺ-ի դպքում դիտվում է լիմֆոիդ բջիջների քանակության նվազում փայծաղի բոլոր տեղամասերում [Zakaryan et al., 2015]:

Վիրուսով խթանված սուր վիրեմիայի ժամանակ լիմֆոցիտները կարող են ենթարկվել արագ քայքայման, ինչը պայմանավորված է ակտիվ վարակիչ գործընթացով: Լիմֆոցիտները կարող են նաև պահվել փայծաղի կամ ավշային հանգույցների կողմից, ինչպես նաև գաղթել դեպի շնչառական համակարգ [McBath et al., 2014]: Վիրուսի թափանցումն օրգանիզմ հանգեցնում է լիմֆոցիտների վերաբաշխմանը հյուսվածքների և արյան միջև, որը պատճառ է հանդիսանում արյան մեջ լիմֆոպենիայի զարգացման համար: Այս երևույթը բնորոշ է վիրեմիա առաջացնող մեծաթիվ վիրուսների [Bautista et al., 2003, Pedersen et al., 2015]: Սակայն ի տարբերություն մյուս վիրուսային հիվանդությունների սուր ԽԱԺ-ը բնութագրվում է արագընթաց զարգացմամբ, ավելի վառ արտահայտված լիմֆոպենիայով: Այս դեպքում լիմֆոպենիան կարող է զարգանալ ոչ միայն լիմֆոցիտների վերաբաշխման, այլ նաև նրանց քայքայման հետևանքով: Մեր ուսումնասիրությունների արդյունքներում գրանցվում է լիմֆոցիտների թվի կրճատում հետազոտված բոլոր օրգաններում և հյուսվածքներում՝ ոսկրածուծ, փայծաղ, ավշային հանգույցներ, արյուն [Karalyan et al., 2012b, Zakaryan et al., 2015]:

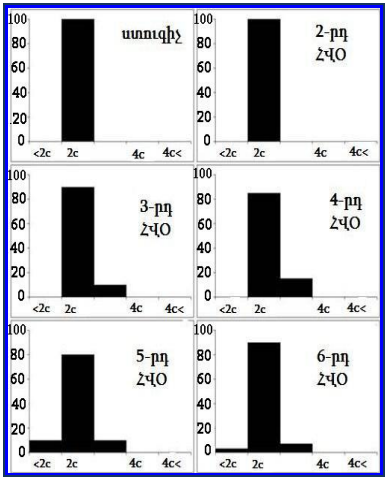
Այսպիսով, հաշվի առնելով լիմֆոցիտների քանակի կրճատումը վերոնշյալ օրգաններում և հյուսվածքներում, կարող ենք եզրակացնել, որ լիմֆոպենիան զարգանում է լիմֆոցիտների քայքայման հետևանքով (ըստ գրականության տվյալների՝ հիմնականում ապոպթոզով): Մեր կողմից ստացված այս տվյալները համընկնում են այլ հեղինակների կողմից կատարված ԽԱԺ-ի ուսումնասիրությունների արդյունքների հետ [Carrasco et al., 1996b, Gómez-Villamandos et a.l, 2003]:

Փայծաղի լիմֆոցիտների և լիմֆոբլաստների կորիզային ԴՆԹ-ի, սպիտակուցների քանակական փոփոխությունները:

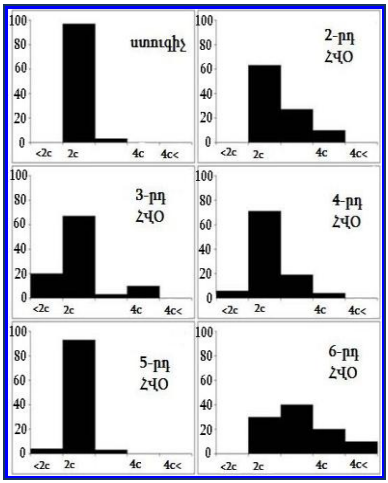
Փայծաղի պարենքիմայի լիմֆոցիտների և լիմֆոբլաստների բջջաբանական և մորֆոֆունկցիոնալ փոփոխություններն ուսումնասիրել է բջջասպեկտրո-

ֆոտոմետրիայի մեթոդի օգնությամբ: Ինչպես երևում է նկար 9-ում առողջ խոզերի փայծաղի լիմֆոցիտները դիպլոիդ են: Հիվանդության վաղ փուլերում դիպլոիդությունը նույնպես բնորոշ է այդ բջիջներին: Հիվանդության զարգացմանը զուգահեռ հայտնվում են հիպերդիպլոիդ լիմֆոցիտներ, ինչը վկայում է այդ բջիջների կորիզային ԴՆԹ-ի պրոլիֆերացիայի մասին: Նկար 9-ից երևում է, որ 4-րդ ՀՎՕ-ում այդպիսի լիմֆոցիտների քանակը գերազանցում է 15%-ը: Հիվանդության ավելի ուշ փուլերում (5-6-րդ ՀՎՕ), հայտնվում են նաև հիպոդիպլոիդ լիմֆոցիտներ: Այս երևույթը բնորոշ է ապոպթոզային գործընթացներին [Mello et al., 2009]:

Ինչ վերաբերում է փայծաղի լիմֆոբլաստների կորզների բաշխմանը ըստ ԴՆԹ-ի պլոիդության դասերի, ապա այստեղ նույնպես ԽԱԺ-ի վաղ փուլում՝ 2-րդ ՀՎՕ-ում գրանցվում է հիստոգրամի տեղաշարժ դեպի աջ. լիմֆոբլաստների պոպուլյացիայի պրոլիֆերատիվ ակտիվության հետևանքով հայտնաբերվում են մինչև տետրապլոիդ բջիջներ, որոնք պահպանվում են ԽԱԺ-ի հետագա և վերջնական փուլերում (նկար 10): Լիմֆոբլաստներում զարգացող ապոպթոզային գործընթացները, որոնք նպաստում են հիպոդիպլոիդ լիմֆոբլաստների հայտնաբերմանը, հետևապես, հիստոգրամի դեպի ձախ տեղաշարժին, գրանցվում են 3-րդ ՀՎՕ-ից: Հիվանդության հետագա օրերին հիպոդիպլոիդ լիմֆոբլաստների քանակությունը բջիջների ընդհանուր պոպուլյացիայում նվազում է, իսկ վերջնական փուլում անհետանում:



Նկար 9 – Լիմֆոցիտներ:

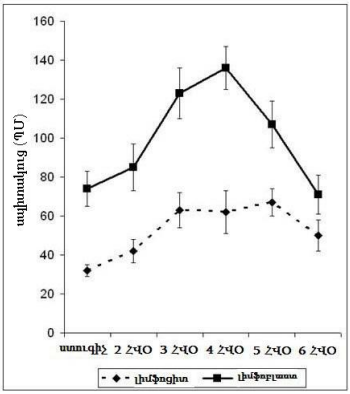


Նկար 10 – Լիմֆոբլաստներ:

Կորիզների բաշխումը ըստ ԴՆԹ-ի պլոիդության դասերի:
Աբցիսների առանցք՝ պլոիդության դասերը ըստ ԴՆԹ-ի պարունակության,
Օրդինատների առանցք՝ ընդհանուր պոպուլյացիայում բջիջների պարունակությունը %-ով:

Նկար 11-ից երևում է, որ 2-րդ ՀՎՕ-ից փայծաղի լիմֆոցիտներում և լիմֆոբլաստներում տեղի է ունենում սպիտակուցի քանակության ավելացում: 3-րդ օրից սպիտակուցների քանակությունների տարբերությունը դառնում է արժանահավատ առողջ խոզերի տվյալների համեմատ: Լիմֆոցիտներում և

լիմֆոբլաստներում սպիտակուցների ավելացած քանակությունը պահպանվում է մինչև հիվանդության 5-րդ օրը ներառյալ: Հիվանդության վերջնական փուլում լիմֆոբլաստներում սպիտակուցի քանակությունը չի տարբերվում ստուգիչ խմբի տվյալներից, իսկ լիմֆոցիտներում գրանցվում է միտում ($p<0.1$):



Նկար 11 - Փայծաղի լիմֆոցիտներում և լիմֆոբլաստներում սպիտակուցի պարունակությունը: Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր, Օրդինատների առանցք՝ սպիտակուցների պարունակությունը պայմանական միավորներով (ՊՄ):

Լիմֆոցիտներում և լիմֆոբլաստներում սպիտակուցների քանակական փոփոխությունների հնարավոր պատճառները քննարկվել են վերևում: ԽԱԺ-ի դինամիկայում փայծաղի լիմֆոիդ պոպուլյացիայի բջիջների մակերեսների փոփոխությունները ներկայացվում են աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 3.

Փայծաղի լիմֆոիդ բջիջների մակերեսները սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում (մկմ^2)

Բջիջներ	ստուգիչ	2-րդ ՀՎՕ	3-րդ ՀՎՕ	4-րդ ՀՎՕ	5-րդ ՀՎՕ	6-րդ ՀՎՕ
Լիմֆոցիտ	88.3±9.2	97.3±9.8	98.1±14.3	102.5±10.4*	100.2±16.5	99.9±8.5*
Լիմֆոբլաստ	97.4±9.8	105.1±18.9	112.3±9.7*	104.6±11.0*	107.1±10.7*	100.2±23.1

*շեղումների քանակն ըստ Վիլկոքսոն-Մանն-Ուիթնիի Ս չափանիշի հավասար է 2-ի ($p<0.1$)

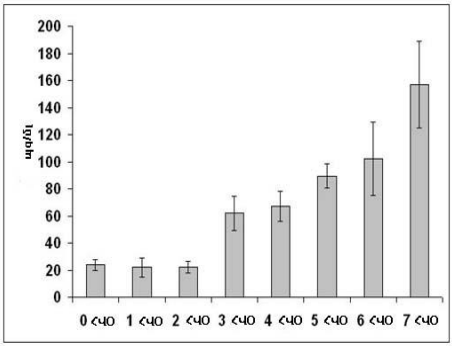
Ինչպես երևում է աղյուսակից հիվանդության բոլոր օրերին, ստուգիչ խմբի հետ համեմատելով, փայծաղի (ի տարբերություն ավշային հանգույցների) լիմֆոցիտների մակերեսների մեծացման արժանահավատ տվյալներ չեն ստացվել: Սակայն սկսած հիվանդության որոշ օրերից (3-րդ օր) դիտվում է բջիջների մակերեսների մեծացման միտում ստուգիչի համեմատ:

Նախաբորբոքային ցիտոկինների սինթեզը սուր ԽԱԺ-ի զարգացման գործընթացում

Բորբոքային ռևմատիկ հիվանդությունների ախտածագման մեջ կարևոր նշանակություն ունեցող նախաբորբոքային ցիտոկինների խմբին են պատկանում ՈՒՆԳ-α-ն, ԻԼ-1-ը, ԻԼ-6-ը և ԻԼ-8-ը: ՈՒՆԳ-α-ն և ԻԼ-1-ը սինթեզվում են զուգահեռաբար, օժտված են մեկը մյուսի սինթեզը խթանելու հատկությամբ և դրսևորում են բազմաթիվ ընդհանուր ազդեցություններ: Հայտնի է, որ բջջային և հումորալ իմունային ռեակցիաներում առաջատար դեր ուենեն ակտիվացած

մակրոֆագերի կողմից արտազատված ՈՒՆԳ-α-ն և ԻԼ-1β-ն: ԻԼ-1-ի կարևորագույն դերը Տ-լիմֆոցիտների ակտիվացումն է, որոնք միացնում են բջջային և հումորալ իմունային պատասխանները: Այս երկու հիմանական կարգավորիչ ցիտոկինների հավասարակշռությունից է կախված տարբեր վիրուսայի հիվանդությունների ընթացքը և ելքը:

Մեր աշխատանքում ուսումնասիրել ենք հիմնական նախաբորբոքային ցիտոկինների քանակական տեղաշարժերը ԽԱԺ-ի դինամիկայում:



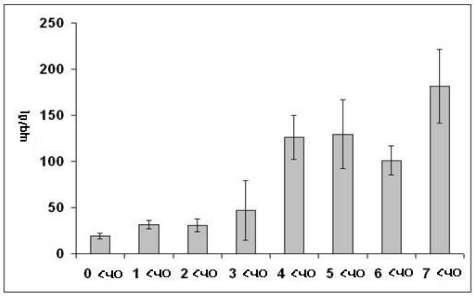
Նկար 12-ում ներկայացվում է շիճուկային ԻԼ-1β-ի քանակական փոփոխություններն ստուգիչ խմբում և սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում:

Նկար 12 - Շիճուկային ԻԼ-1β-ի մակարդակներն ստուգիչ խմբում և սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում:
Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր,
Օրդինատների առանցք՝ ցիտոկինի մակարդակը պգ/մլ-ով:

Ինչպես երևում է նկար 12-ից հիվանդության վաղ փուլերում ԻԼ-1β-ի մակարդակը չի տարբերվում ստուգիչ խմբի ցուցանիշներից: 3-րդ ՀՎՕ-ից գրանցվում է այս ցիտոկինի մակարդակի արժանահավատ բարձրացում: Այս բարձրացումը աստիճանաբար աճում է 3-7-րդ օրերին և ցուցաբերում է վիճակագրական արժանահավատություն ($p<0.05$ – $p<0.01$):

Ընդհանուր առմամբ, շիճուկային ԻԼ-1-β-ի մակարդակի զգալի բարձրացումը զարմանալի չէ: Այն հայտնաբերվում է սեպտիկ շոկի ժամանակ տարբեր բակտերիալ և վիրուսային ծանր վարակների դեպքում [Escaffre et al., 2013]:

Հետազոտությունների հաջորդ փուլում որոշվել է ԻԼ-6-ի քանակական տեղաշարժը ԽԱԺ-ի վիրուսով վարակված խոզերի արյան շիճուկում: Հետազոտության արդյունքները ներկայացվում են նկար 13-ում:

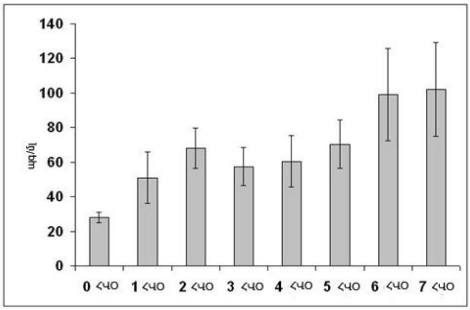


Նկար 13 - Շիճուկային ԻԼ-6-ի մակարդակներն ստուգիչ խմբում և սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում:
Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր,
Օրդինատների առանցք՝ ցիտոկինի մակարդակը պգ/մլ-ով:

Ինչպես երևում է նկար 13-ից հիվանդության 4-րդ օրից ԻԼ-6-ի մակարդակն արժանահավատ գերազանցում է ստուգիչ խմբի ցուցանիշներին ($p<0.05$ – $p<0.01$): 4-7-րդ օրերին հիվանդ խոզերի արյան շիճուկում ԻԼ-6-ի մակարդակն առողջ խոզերի համեմատ գերազանցում է 7-10 անգամ:

ԻԼ-6-ը համարվում է բորբոքման սուր փուլի կարևոր միջնորդանյութերից մեկը և կարող է վնասել հյուսվածքներն աուտոիմուն ռեակցիայի հետևանքով: Հաշվի առնելով ԽԱԺ-ի վիրուսի թիրախ բջիջների վերաբերյալ տվյալները, հասկանալի է դառնում, որ ԻԼ-6-ի բոլոր պրոդուցենտ բջիջները շատ զգայուն են վիրուսի ազդեցության նկատմամբ:

Նկար 14-ում ներկայացվում է շիճուկային ԻԼ-8-ի քանակական փոփոխություններն ստուգիչ խմբում և սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում:

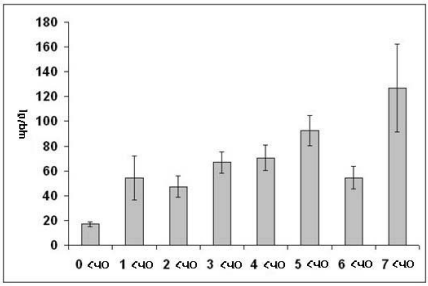


Նկար 14 - Շիճուկային ԻԼ-8-ի մակարդակներն ստուգիչ խմբում և սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում:
Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր,
Օրդինատների առանցք՝ ցիտոկինի մակարդակը պգ/մլ-ով:

Հիվանդության առաջին օրից գրանցվում է ԻԼ-8-ի մակարդակի բարձրացման միտում ($p<0.1$): Իսկ 2-րդ օրից սկսած մինչև հիվանդության ավարտը շիճուկային ԻԼ-8-ի մակարդակի բարձրացումը դառնում է արժանահավատ ($p<0.05$) (նկար 14):

ԻԼ-8-ը պատկանում է քեմոկինների խմբին, որոնց հիմնական հատկությունն է ապահովել տարբեր տեսակի բջիջների քեմոտաքսիսը բորբոքման օջախում: Այդ բջիջներն են նեյտրոֆիլները, մոնոցիտները, էոզինոֆիլները, Т բջիջները: Այդ իսկ պատճառով ԻԼ-8-ը համարվում է ախտածնի թափանցման վայրում զարգացող բորբոքային ռեակցիայի կարևորագույն գործոնը:

Սուր ԽԱԺ-ի դեպքում ԻԼ-8-ի քանակական տեղաշարժերի վերաբերյալ հետազոտություններն առաջին անգամ իրականացվել են մեր լաբորատորիայում [Zakaryan et al., 2015]:



Նկար 15 - Շիճուկային ՈւՆԳ–α-ի մակարդակներն ստուգիչ խմբում և սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում:
Աբցիսների առանցք՝ հետվարակային օրեր,
Օրդինատների առանցք՝ ցիտոկինի մակարդակը պգ/մլ-ով:

Վիրուսով վարակելուց 24 ժամ անց արդեն գրանցվում է ՈւՆԳ–α-ի մակարդակի աճի միտում ($p<0.1$): Իսկ 2-րդ օրից սկսած մինչև հիվանդության ավարտն առողջ խոզերի համեմատ շիճուկային ՈւՆԳ–α-ի մակարդակի բարձրացումը դառնում է

արժանահավատ ($p<0.05$): Բացառություն է կազմում միայն 3-րդ օրը, երբ դիտվում է միտում ($p<0.1$) (նկար 15): ԽԱԺ-ի դեպքում ՈՒՆԳ–α-ի *in vivo* քանակական չափումներ սկսել են կատարվել դեռևս 1999թ-ից [Gómez del Moral et al., 1999], և այս ցիտոկինի մակարդակի աճ գրանցվել է միայն 3-րդ ՀՎՕ-ից: Մեր կողմից ստացված տվյալները հաստատում են շիճուկային ՈՒՆԳ–α-ի մակարդակի աճը, բայց հիվանդության ավելի վաղ շրջանում՝ 24-րդ ժամին (ենթադրում ենք, որ ՈՒՆԳ–α-ի քանակի ավելացման ավելի վաղ դրսևորման պատճառ է հանդիսանում մեր կողմից օգտագործված ԽԱԺ-ի գենետիպ II վիրուսը):

ԽԱԺ-ի դինամիկայում մեր կողմից հետազոտված ցիտոկինների մակարդակների վերլուծության համար իրականացրել ենք կորելացիոն վերլուծություն: Այս տվյալները բերվում են աղյուսակ 4-ում:

Աղյուսակ 4.

ԽԱԺ-ի դինամիկայում նախաբորբոքային ցիտոկինների մակարդակների կորելացիան

		ԻԼ-1β	ԻԼ-6	ԻԼ-8	ՈՒՆԳα
ԻԼ-1β	Պիրսոնի կորելացիայի գործակից	1	0.918**	0.832*	0.844**
	Արժանահավատություն (p)	-	0.001	0.010	0.008
ԻԼ-6	Պիրսոնի կորելացիայի գործակից	0.918**	1	0.739*	0.876**
	Արժանահավատություն (p)	0.001	-	0.036	0.004
ԻԼ-8	Պիրսոնի կորելացիայի գործակից	0.832*	0.739*	1	0.698
	Արժանահավատություն (p)	0.010	0.036	-	0.054
ՈՒՆԳ-α	Պիրսոնի կորելացիայի գործակից	0.844**	0.876**	0.698	1
	Արժանահավատություն (p)	0.008	0.004	0.054	-

** Կորելացիան արժանահավատ է 0.01 մակարդակում ($p<0.01$)

* Կորելացիան արժանահավատ է 0.05 մակարդակում ($p<0.05$)

Աղյուսակ 4-ից պարզ երևում է, որ մեր կողմից հետազոտված նախաբորբոքային ցիտոկինների մակարդակները ցույց են տալիս արժանահավատ և փոխադարձ բարձր դրական կորելացիա: Դա վկայում է ԽԱԺ-ի դինամիկայում վերոհիշյալ ցիտոկինների ավելացած սինթեզի և շիճուկում նույնատիպ քանակական տեղաշարժերի մասին: Նման տեղաշարժերը բնորոշ են յուրահատուկ ախտաբանական գործընթացներին: ԽԱԺ-ի ախտաբանության զարգացման մի մասը կապված է այս ցիտոկինների սինթեզի ավելացման հետ [Carrasco et al., 2002, Zakaryan et al., 2015]:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Սուր ԽԱԺ-ի (խոզերի աֆրիկյան ժանտախտ) դինամիկայում իմունային համակարգի ծայրամասային օրգաններում՝ ավշային հանգույցներում և փայծաղում, հայտնաբերվել են ախտաբանական փոփոխություններ, որոնք արտահայտվել են բազմաթիվ արյունազեղումներով, համապատասխան օրգանների դատարկմամբ, ընդհանուր հիպոպլազիայով:

2. Սուր ԽԱԺ-ի դեպքում տեղի է ունենում իմունային համակարգի ծայրամասային օրգանների՝ ավշային հանգույցների և փայծաղի բջջային պոպուլյացիայի կազմի փոփոխություն: Հիվանդության ընթացքում ավշային հանգույցներում և փայծաղում աճում է էրիթրոիդ և միելոիդ պոպուլյացիաների մասնաբաժինը՝ ի հաշիվ լիմֆոիդ պոպուլյացիայի նվազման:
3. Իմունային համակարգի ծայրամասային օրգաններում ԽԱԺ-ի զարգացմանը զուգահեռ զարգանում է լիմֆոպենիա: Լիմֆոպենիայի զարգացման պատճառներն են հանդիսանում ինչպես լիմֆոցիտների գաղթը դեպի ներքին օրգաններ, այնպես էլ նրանց քայքայումը:
4. Սուր ԽԱԺ-ի դինամիկայում 2-րդ ՀՎՕ-ից (հետվարակային օր) սկսած հայտնաբերվել է լիմֆոցիտների ակտիվացում, ինչը արտահայտվում է մեր կողմից հետազոտված բոլոր բջջային պոպուլյացիաներում այդ բջիջների մակերեսների մեծացմամբ և սպիտակուցի պարունակության ավելացմամբ:
5. Մեր կողմից հայտնաբերվել է լիմֆոիդ բջիջների պրոլիֆերատիվ ակտիվության աճ՝ արտահայտված պլոիդության հիստոգրամի դեպի աջ տեղաշարժով, ինչը վկայում է ԴՆԹ-ի խթանված սինթեզի մասին: Այս երևույթը կարող է խթանվել ԽԱԺ-ի գենետիպ II վիրուսի ուղղակի ազդեցությամբ և/կամ իմունային համակարգի պատասխանով:
6. Սուր ԽԱԺ-ի իմունաախտածնության հիմնական մեխանիզմներից մեկը հանդիսանում է ցիտոկինների համակարգի անհավասարակշռությունը՝ դրսևորված նախաբորբոքային ցիտոկինների հիպերցիտոկինեմիայով. ՈՒՆԳ-α-ի և ԻԼ-8-ի մակարդակի բարձրացումը գրանցվել է հիվանդության վաղ փուլերում, իսկ ԻԼ-1β-ի և ԻԼ-6-ի մակարդակները՝ ավելի ուշ փուլերում:
7. Գենոտիպ II վիրուսով պայմնավորված ԽԱԺ-ը հանդիսանում է իմունամիջնորդավորված վարակիչ հիվանդություն: ԽԱԺ-ի կլինիկական և ախտագենետիկական դրսևորումները հիմնականում պայմանավորված են համակարգային իմունային պատասխանի ռեակցիաներով:

ՀՐԱՏԱՐԱԿՈՒՄՆԵՐԻ 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. Սիմոնյան Լ. Ավշային հանգույցների ախտահարումը խոզերի աֆրիկյան սուր ժանտախտի (գենոտիպ II) ժամանակ: // Հայաստանի կենսաբանական հանդես: 2014; 3(66):24-28.
4. 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

5. Симонян Л., Каралян З. Вирусные геморрагические лихорадки свиней и развитие системного иммунного воспалительного ответа. // Вопросы теоретической и клинической медицины. Научно-практический журнал. 2015; 18, 3(99):18-20.

СИМОНЯН ЛУСИНЕ НОРАЙРОВНА

ПАТОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ОСТРОЙ ФОРМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова - африканская чума свиней, лимфоцит, лимфатический узель, провоспалительные цитокины

Течение экспериментальной инфекции вируса африканской чумы свиней (АЧС) не отличалась от таковой в доступных источниках и достигала агональной стадии, к концу 6х или на 7-8 сутки с момента заражения. Первые 2 суток после заражения протекали практически бессимптомно, несмотря на виремию, наблюдаемую начиная со 2-х суток. Затем, начиная с 3-4 суток наблюдалась гипертермия, потеря аппетита, после чего следовало быстрое нарастание основной симптоматики, выражающееся в подъеме температуры наружных покровов тела до 40-41^{0}С, снижении активности, затруднении дыхания. На 5-6 сутки у некоторых животных наблюдалась кровь в фекалиях. Симптоматика нарастала, и на терминальной стадии (начало 7-х суток) животные умерщвлялись согласно протоколу.

В клеточном звене иммунной системы свиней при АЧС происходит значимые изменения. В организме свиней наблюдается тотальная лимфопения: в селезенке, лимфатических узлах, костном мозге, периферической крови (последние выявлены в более ранних работах нашей лаборатории). Приобретенная лимфопения встречается при большом числе различных заболеваний. Помимо алиментарных причин, наиболее важными причинами лимфопении являются инфекционные заболевания, и в частности вирусные. Лимфопения может быть следствием нарушения продукции лимфоцитов, вызванной непосредставенным повреждением структуры тимуса или лимфоузлов. Однако подобных явлений при АЧС не наблюдается. При острой виремии, вызванной рядом вирусов, лимфоциты могут подвергаться ускоренному разрушению, обусловленному активным инфекционным процессом. Подобные явления были описаны нами в виде разрушенных лимфоидных клеток, которые обнаруживались во всех органах иммунной системы и крови (на 3-5 дпи). Вероятно из-за подобных процессов в кровь из костного мозга вымывается большое количество незрелых лимфоидных клеток (уже начиная с ранней стадии заболевания).

Популяция ядросодержащих клеток эритроидного ряда начиная с 5-ого дня заболевания достоверно возрастает, и ее доля в общей популяции селезенки и

лимфатических узлов увеличивается более, чем в 10 раз. Этот рост происходит как за счет уменьшения содержания лимфоцитов, так и за счет нарушения эритропоеза, и в частности созревания эритроцитов. Лимфопения на 2-5 дпи АЧС, сопровождается увеличением доли морфологически измененных клеток, синтезирующих больше белка, и имеющим большие размеры. Это, согласно данным литературы имеет непосредственное отношение к увеличению активности лимфоцитов. Одновременно с этими процессами происходит смещение гистограммы распределения ядер лимфоидной популяции по классам плоидности ДНК вправо, что является свидетельством пролиферации данных клеток.

С учетом всех вышеперечисленных изменений, популяция лимфоцитов на заключительных стадиях АЧС может рассматриваться как система с нарушенными соотношениями процессов пролиферации и дифференцировки. Уменьшение количества циркулирующих лимфоцитов в периферической крови на раннем этапе АЧС (1-2дпи) выявленное ранее, теперь можно полагать, является следствием не только, и не столько миграцией лимфоцитов из циркулирующей крови в очаги воспаления и регионарные лимфатические узлы (практически все, вследствие виремии), но преимущественно апоптоза этих клеток.

Исследования продукции провоспалительных цитокинов при АЧС выявили повышение уровней всех основных цитокинов на ранних этапах АЧС. С 3 дня заболевания происходит достоверное повышение содержания ИЛ-1β. Сывороточные уровни ИЛ-6 достоверно превосходят контрольные показатели на 4 сутки после инфицирования. Уже через 24 часа после заражения вирусом, нами показаны выраженная тенденция к росту сывороточного уровня фактора некроза опухоли-α (ФНО-α). А с 3 дня заболевания, и до конца заболевания, разница по сравнению со здоровыми свинями становится достоверной. Сходная картина наблюдается и содержанием ИЛ-8: на раннем этапе заболевания (с 1 после заражения вирусом) выявлется выраженная тенденция к подъему уровней Ил-8. А начиная с 3 дня и до конца заболевания повышение содержания сывороточного ИЛ-8 становится достоверным. Причины повышения уровня провоспалительных цитокинов остаются окончательно не изученными. Также, активация цитокинов тесно связана с аутоиммунными механизмами, оксидативным стрессом, инфекционным процессом и накоплением вследствие этого эндотоксинов. Подобное явление характерно для достаточно специфического патогенеза, называемого цитокиновый шторм.

Такие изменения характерны для синдром системного воспалительного ответа – который является неспецифическим системным воспалительным ответом на септические и виремические состояния, и является предвестником синдром полиорганной дисфункции и полиорганной недостаточности. Последние являются одной из основных причин высокой смертности при синдроме системного воспалительного ответа.

Таким образом, африканская чума свиней, обусловленная генотипом II, является иммуноопосредованным инфекционным заболеванием.

LUSINE NORAYR SIMONYAN

IMMUNE SYSTEM PATHOLOGY IN ACUTE AFRICAN SWINE FEVER

SUMMARY

Key words – African swine fever, lymphocyte, lymph node, proimflammatory cytokines

The course of experimental infection of African swine fever (ASF) virus did not differ from that of the available sources and had reached the agonal stage by the end of 6 or 7-8 pid (post-infection day). The first 2 post-infection days proceeded asymptomatic despite viremia observed starting on 2nd day. Then starting from 3-4 pid there was hyperthermia, loss of appetite, followed by a rapid development of the main symptoms, manifested in the rise of the temperature to 40-41°C, decreased activity, difficulty in breathing. In some animals blood in faeces was revealed on 5-6 pid. Symptoms developed gradually and in final-stage (starting at 7 pid) the animals were killed according to the protocol.

In ASF dynamics the cells of immune system have undergone significant changes. Total lymphopenia was observed in pig organism: in spleen, lymph nodes, bone marrow, peripheral blood (the latter was identified in earlier studies in our laboratory). Acquired lymphopenia occurs in the cases of many different diseases. Besides nutritional reasons, the most important causes of lymphopenia are infectious diseases, particularly viral. Lymphopenia may be the result of lymphocyte production disorder caused by direct damage of the thymus or lymph node structure. However, such phenomenon was not observed in ASF. In acute viremia caused by a number of viruses, lymphocytes undergo rapid destruction caused by active infection. We described destroyed lymphoid cells in all organs of the immune system and blood (at 3-5 pid). Probably because of such processes a large number of immature lymphoid cells are revoved from bone marrow into the blood (starting from the early stage of the disease).

The population of nucleated erythroid cells from 5 pid was significantly increased and its proportion in the total population of the spleen and lymph nodes was increased more than 10 times. Such changes occur due to reduction of lymphocytes and affection of erythropoiesis, particularly by abnormal maturation of red blood cells. Lymphopenia at 2-5 pid was accompanied by an increase in the proportion of morphologically altered cells synthesizing more protein and having large sizes. According to the literature this relates to increased activity of lymphocytes. Along with these processes, there is a shift of nuclei distribution histogram of lymphoid population by class of DNA ploidy to right, which is an evidence of the proliferation of these cells.

Taking into account all of the above mentioned changes population of lymphocyte in the final stages of ASF can be considered as a system with broken relations of proliferation and differentiation. Reducing number of circulating lymphocytes in the

peripheral blood at an early stage of ASF (1-2 pid) detected earlier, can now be considered to be a consequence not only and not so much as migration of lymphocytes from circulating blood to the inflammation sites and the regional lymph nodes (almost all due to viremia) but predominantly apoptosis of these cells.

The study of proinflammatory cytokines production in ASF revealed all major cytokines levels increasing in the early stages of ASF. From 3-rd day of the disease the level of IL-1β was significantly increased. Serum levels of IL-6 compared with the control ones were increased significantly on 4th pid. After 24 hours of getting infected with the virus pronounced tendency in increasing level of tumor necrosis factor-α (TNF-α) in blood serum was revealed. From 3rd pid until the end of the disease the difference compared to healthy pigs become significant. The similar changes were observed in IL-8 level: an early stage of the disease (1 pid) was observed pronounced tendency to lift the levels of IL-8. And starting from 3rd days till the end of the disease increase of level of serum IL-8 becomes significant. The reasons for increasing levels of proinflammatory cytokines are not completely understood. Also activation of cytokine is closely related to autoimmune mechanisms, oxidative stress and infectious process which result accumulation of endotoxins. This phenomenon is typical for a fairly specific pathogenesis called cytokine storm.

These changes characterize systemic inflammatory response syndrome - not specific systemic inflammatory response to septic and viremic conditions, which is harbinger of multiple organ dysfunction syndrome. This syndrome is the main reason of high mortality in systemic inflammatory response syndrome.

Thus, African swine fever caused by genotype II virus is immunomediated infectious disease.