

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

САРОЯН ДАВИД АШОТОВИЧ

НАРУШЕНИЕ МИЕЛОПОЭЗА ПРИ ОСТРОЙ ФОРМЕ  
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности:

03.00.03 – «Молекулярная и клеточная биология»

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Караян Завен Александрович

ЕРЕВАН-2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	7
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1. Общая патология АЧС .....	12
1.2. Изменения нейтрофилов под действием АЧС .....	15
1.3. Роль нейтрофилов в вирусных инфекциях .....	18
1.4. Патология нейтрофилов при классической чуме свиней. ....	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1. Субъекты и объекты исследования. ....	26
2.2. Вирус и модель африканской чумы свиней. ....	26
2.3. Титрация и определение дозы вируса. ....	26
2.4. Приготовление исследуемых образцов. ....	27
2.5. Морфологический анализ клеток. ....	27
2.6. Окраска ДНК по Фельгену и цитофотометрия ДНК. ....	28
2.7. Окраска РНК галлоцианин-хромовыми квасцами. ....	29
2.8. Статистическая обработка. ....	29
2.9. Определение концентрации ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМ-КСФ в плазме крови. ....	30

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. . . . .	32
3.1. Патогенез миелоидных клеток периферической крови свиней в норме и при экспериментально вызванной острой форме африканской чумы. . . . .	32
3.1.1. Популяционный анализ миелоидных клеток периферической крови свиней в контроле и в динамике острой формы африканской чумы . . . . .	32
3.1.2. Динамика изменений площади и содержания РНК в миелоидных клетках периферической крови в процессе острой формы африканской чумы свиней. . . . .	36
3.1.3 Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток периферической крови при острой форме АЧС. . . . .	41
3.2. Патогенез миелоидных клеток костного мозга свиней в норме и при экспериментально вызванной острой форме африканской чумы . . . . .	44
3.2.1. Популяционный анализ миелоидных клеток костного мозга свиней в норме и в динамике острой формы африканской чумы. . . . .	44
3.2.2. Динамика изменений площади и содержания РНК в миелоидных клетках костного мозга в процессе острой формы африканской чумы свиней. . . . .	48
3.2.3. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток костного мозга при острой форме АЧС. . . . .	53
3.3. Патогенез миелоидных клеток в первичной культуре свиней в норме и при культивировании с вирусом африканской чумы. . . . .	56
3.3.1. Популяционный анализ и динамика транскрипционной активности миелоидных клеток ПККМ свиней без и при действии вируса АЧ. . . . .	54
3.3.2. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток первичной культуры костного мозга свиней без и с воздействием вируса АЧ. . . . .	64

3.4. Динамика изменений содержания ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМ-КСФ в сыворотке крови при острой форме АЧС. ....	66
ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ....	81
ВЫВОДЫ. ....	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. ....	85

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АНЦА – анти-нейтрофильные цитоплазматические аутоантитела

АФК (ROS) – активные формы кислорода

АЧС – африканская чума свиней

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЯЭ – вирус японского энцефалита

ГАД – гемадсорбционная доза

ГАЕ – гемадсорбционная единица

ГХК – галлоцианин-хромовые квасцы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дпи – дни после инфицирования

ИС – индекс сдвига

ИСН – индекс сдвига нейтрофилов

КМ – костный мозг

КМИСН - костномозговой индекс созревания нейтрофилов

КСФ – вирус классической свинной лихорадки

КЧС – классическая чума свиней

ЛПС – липополисахарид

МПО – миелопероксидаза

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НВЛ (NET) – нейтрофильные внеклеточные ловушки

ПККМ – первичная культура костного мозга

РМА – форболмиристатацетат

РНК – рибонуклеиновая кислота

РСВ (RSV) – респираторно-синцитиальный вирус

ЦМВ – цитомегаловирус человека

ФМА – форболмиристал ацетат

ЦПД – цитопатическое действие

чпи – часов после инфекции

CD – кластер дифференцировки

G-CSF, GCSF (Г-КСФ, ГКСФ) – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF, GMCSF (ГМ-КСФ, ГМКСФ) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IL (ИЛ) – интерлейкин

INF (ИФ) – интерферон

M-CSF (М-КСФ) – макрофагальный колониестимулирующий фактор

MPO – миелопероксидаза

NF- $\kappa$ B – ядерный фактор «каппа-би»

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

TNF (ФНО) – фактор некроза опухоли

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Современный этап естественной истории африканской чумы свиней охватывает постоянное неблагополучие традиционных природно-очаговых нозоареалов Африки, а также эпизоотии и отдельные вспышки болезни в различных странах Европы (Coggins 1974; Hess et al. 1971). С начала 21 века африканская чума свиней появилась в Грузии, а затем в Армении (Beltrán-Alcrudo et al. 2008). Известно, что возбудителем заболевания является крупный оболочечный вирус, содержащий двуспиральную ДНК. Независимо от способа распространения вирус 100% поражает домашних и диких свиней всех возрастов и при острой форме вызывает 100% летальность. Он размножается в клетках иммунной системы и, прежде всего, в клетках моноцитарно-макрофагального ряда (Martins et al. 1988), которые являются первой и основной мишенью репликации вируса АЧС (Minguez et al. 1988).

Физиология клеток системы мононуклеарных фагоцитов и их значение в иммунном ответе достаточно исследованы и описаны (Sanchez-Cordon et al. 2005). Решены наиболее общие проблемы, касающиеся значения мононуклеарных фагоцитов в инфекционном процессе для патогенов с внутриклеточной локализацией (Cavallazzi et al. 2010). Однако остаются малоизученными многочисленные аспекты биологии и патологии инфекционных процессов в тех случаях, когда гемопоэтические клетки являются критической мишенью или имеют преобладающее значение в размножении *in vivo* возбудителей различной природы, как и при АЧС, так и когда гемопоэтические клетки спонтанно чувствительны к вирусу АЧС. *In vitro* вирус размножается и обычно культивируется в моноцитах/макрофагах из различных тканевых источников и обнаруживается, главным образом, в клетках макрофагального ряда (Murtaugh et al. 1996; Salguero et al. 2002; Artur Summerfield et al. 1998). Однако он способен реплицироваться и в других клетках лейкоцитарной линии, наибольшее значение из которых имеют нейтрофилы (Carrasco et al. 1992; Fernández et al. 1992). Последние являются самыми распространенными и важными клетками неспецифической защиты внутренней среды организма животных и человека от инфекций (бактерий и вирусов) (Carrasco et al. 1992; Fernandez, Perez, Martin de las Mulas, et al. 1992; Ballester et al. 2010). Отсюда и важность исследования количественного и качественного состава клеточных элементов системы

крововетворения, и, в частности, популяции миелоидных клеток, так как изменения, выявляемые в них, являются доступными и важными индикаторами нарушений в системе крововетворения и функционирования форменных элементов крови, позволяя обнаружить их изменения при определенных патологических состояниях.

Ранее в работах лаборатории было показано, что при острой форме АЧС происходит гибель огромного числа всех видов клеток крови и появление значительного количества незрелых клеток как лимфоидного, так и моноцитарного и миелоидного ряда (Karalyan et al. 2012).

Нейтрофилы являются терминально дифференцированными клетками, которые образуются в костном мозге, где они хранятся и по мере надобности высвобождаются в кровотоки (Vorregaard 2010). Они играют решающую роль в иммунной защите против бактериальных и грибковых патогенов и участвуют в развитии воспалительной реакции (Nathan 2006), а новые исследования выявили также доказательства важной роли нейтрофилов в противовирусной защите хозяина (Jenne et al. 2013). Основной мишенью нейтрофилов являются различные микроорганизмы и вирусы (Vorregaard et al. 2007; Vorregaard 2010).

Известно, что нейтрофилы вырабатывают белки, необходимые для их антимикробной и антивирусной деятельности (Vorregaard et al. 2007). После того, как нейтрофилы попадают в кровь, они начинают искать признаки инфекции, которые приводят к серии явлений, кульминацией которых является миграция нейтрофилов через стенку сосуда в зараженную область (Ley et al. 2007; Nourshargh et al. 2010) и при встрече с инфекцией включается противомикробная или противовирусная программа убийства и фагоцитирования частиц (Nordenfelt & Tapper 2011; Mócsai 2013). Затем включается другая программа для удаления мертвых нейтрофилов макрофагами (El Kebir & Filep 2010). Воспалительные сигналы способны продлить продолжительность жизни нейтрофилов на несколько дней, в течение которых они продолжают бороться с инфекцией (Mantovani et al. 2011). В отсутствие инфекции они умирают по программе апоптоза (Geering & Simon 2011; Witko-Sarsat et al. 2011). Отсюда и важность исследования нарушений миелопоэза в периферической крови и в костном мозге свиней в процессе острой формы африканской чумы.



Изучение первичной культуры костного мозга свиней представляет собой удобную модель для исследования некоторых сторон патогенеза АЧС, и, в частности, дифференцировку и транскрипционную активность различных гемо- и иммунопоэтических клеток. В данной работе нами исследовались популяционные показатели миелоидных клеток первичной культуры костного мозга свиней (ПККМ), их выживаемость и транскрипционная активность, т.к. они являются источником дополнительной репликации вируса (Ballester et al. 2010) и играют решающую роль в иммунной защите против бактериальных, вирусных и грибковых патогенов. Отсюда и необходимость изучения особенностей выживания и динамики транскрипционной активности миелоидных клеток свиней в процессе культивирования и при действии на них вируса АЧС.

#### **Цель работы:**

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

#### **Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:**

1. Исследование морфологически распознаваемых миелоидных клеток периферической крови и костного мозга, здоровых и больных острой формой африканской чумы свиней.
2. Исследование миелоидных клеток ПККМ свиней, зараженных африканской чумой, в течение четырех суток культивирования.
3. Исследование ряда интерлейкинов периферической крови здоровых и больных острой формой АЧ свиней.

Для этого:

- а) На популяционном уровне был проведен морфологический анализ миелоидных клеток периферической крови, костного мозга и первичной культуры костного мозга свиней в контроле и изменение их соотношения на всех стадиях острой формы АЧС

б) На клеточном уровне во всех исследуемых клетках была исследована динамика изменений площади цитоплазмы, ядра и суммарной площади ядрышек всех миелоидных клеток периферической крови, костного мозга и ПККМ свиней в контроле и на всех стадиях острой формы АЧС.

в) На субклеточном уровне во всех исследуемых миелоидных клетках была выявлена динамика изменений в содержании РНК цитоплазмы, ядрышек и суммарных нуклеиновых кислот в ядрах миелоидных клеток. В контроле и на всех стадиях острой формы АЧС. Было определено среднее содержание ДНК в ядрах всех исследованных клеток и построены гистограммы распределения ДНК по классам плоидности в контроле и в процессе острой формы АЧС.

4. Определялась динамика выброса ряда основных противовирусных цитокинов в периферическую кровь.

#### **Научная новизна работы.**

1. Проведено морфологическое исследование динамики изменений в соотношении морфологически распознаваемых миелоидных клеток ПК и костного мозга в контроле и на всем протяжении острой формы АЧС.

2. Проведено морфологическое исследование динамики изменений в соотношении миелоидных клеток первичной нестимулированной культуры костного мозга, зараженной вирусом африканской чумы в течение четырех суток культивирования.

3. Проведено цитоморфометрическое исследование популяции миелоидных клеток периферической крови, костного мозга и ПККМ, определена динамика изменений размеров их ядер, ядрышек и цитоплазмы в контроле и во всех опытах

4. Исследованы изменения в содержании РНК и ДНК в миелоидных клетках периферической крови, костного мозга и культуры костного мозга в динамике острой формы АЧС.

5. Исследована динамика выброса ряда основных противовирусных цитокинов в периферическую кровь.

### **Практическая значимость работы**

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

### **Структура и объём диссертации.**

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

# ГЛАВА 1.

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Общая патология АЧС

Африканская чума свиней (ASF) является одним из наиболее опасных вирусных заболеваний домашних свиней. Возбудитель болезни, вирус африканской чумы (АЧС), большой и комплексный ДНК вирус из рода *Asfivirus* семейства *Asfarviridae* (Takamatsu et al. 2011). В связи с тем, что мягкие клещи рода *Ornithodoros* могут быть привлечены в цикле инфекции, АЧС считается единственным ДНК вирусом, который может быть классифицирован как ARBO (*arthropodborne*) вирус (Kleiboeker 2002).

Вирус в естественных условиях проникает в организм свиней через органы дыхания, пищеварения, поврежденную кожу и слизистые оболочки. Нуклеиновая кислота вируса индуцирует перестройку клеточного метаболизма и активирует гидролитические ферменты, в результате чего усиливается пролиферация клеток лимфоидной ткани. Проллиферирующие клетки представляют собой благоприятную среду для репродукции вируса. В организме вирус быстро распространяется по кровеносным и лимфатическим сосудам, оказывает воздействие на лимфоидную ткань, и на стенки кровеносных сосудов. Действие его усугубляется развитием аллергических реакций, проявляющихся увеличением количества тучных клеток, эозинофилов, а также развитием мукоидного набухания и фибриноидного некроза сосудистых стенок (Gómez-Villamandos et al. 1997).

В организме хозяина, вирус размножается в клетках системы мононуклеарных фагоцитов, преимущественно в моноцитах и макрофагах, хотя на более поздних стадиях заболевания могут быть также инфицированы другие типы клеток (L. Carrasco, Chacón-M De Lara, et al. 1996; L. Carrasco, Gómez-Villamandos, et al. 1996).

Как было показано ранее, у новорожденных поросят первичная виремия происходит приблизительно через 8 часов после инфекции. Вторичная виремия обнаружена через 15 - 24 ч после заражения, а после 30 часов вирус обнаруживается уже почти во всех органах (Anon 2009).

Во время виремии, были найдены гемадсорбционные изоляты АЧС, связанные, в основном, с эритроцитами (Quintero et al. 1986; Wardley & Wilkinson 1977; Plowright et al. 1994), а также с лимфоцитами и нейтрофилами. Инфекция имеет широкий спектр клинических симптомов, но может проходить также практически бессимптомно или сопровождаться геморрагической лихорадкой (Penrith & Vosloo 2009; Takamatsu et al. 2011).

В настоящее время общепринято, что в патогенезе болезни важную роль играет массовое уничтожение макрофагов, нарушение гемостаза за счет высвобождения активных веществ, включая цитокины, факторы комплемента и метаболиты арахидоновой кислоты (Penrith et al. 2004). Свиньи, инфицированные АЧС, обычно страдают от сильной лимфопении, которая может быть результатом апоптоза лимфоцитов.

Провоспалительные цитокины, синтезированные макрофагами, действуют на индукцию апоптоза в популяции лимфоцитов (J.C. Gómez-Villamandos et al. 1995; Gómez-Villamandos et al. 2003; Oura et al. 1998). Хронические формы АЧС могут иметь аутоиммунный компонент: поражение может привести к депозиции иммунными комплексами в тканях почек, легких и кожи с последующим их связыванием с комплементом (Anon 2009; Plowright et al. 1994). Несмотря на интенсивные исследования, большинство из этих патогенетических аспектов еще полностью не описаны.

У домашних свиней и диких кабанов, клинические признаки АЧС значительно отличаются. Отчеты о естественной устойчивости домашних свиней в Африке по-прежнему являются спорными: с большой вероятностью, устойчивость не носит генотипичный характер, так как потомство менее восприимчивых свиней не наследует это преимущество (Penrith et al. 2004). При заражении вирулентным штаммом, клинические признаки развиваются после инкубационного периода, который длится от 2 до 7, редко до 14 дней (Mebus 1988). Клинические признаки могут включать высокую температуру, покрасневшую кожу, тяжелую депрессию, анорексию, конъюнктивит, рвоту, водянистую или кровавую диарею, ускоренное дыхание и пульс, аборт у беременных свиноматок, цианоз и нарушение координации (Anon 2009).

Острые летальные формы могут сопровождаться геморрагическими поражениями (Gómez-Villamandos et al. 2003). Последние характеризуются тромбоцитопенией, точечными

кровоизлияниями и повышенной сосудистой проницаемостью. При менее острых формах заболевания часто проявляются респираторные симптомы (кашель, чихание, и одышка) и желудочно-кишечные поражения (в основном водянистая диарея, но также запоры). В зависимости от штамма вируса, смертность составляет от 3 до 100%.

Штамм вируса АЧС (генотипа II), в настоящее время поражающий страны Закавказья (в том числе Армению), Россию и Украину, является весьма опасным и приводит к упомянутой выше клинической картине – от сильной лихорадки, покраснение кожи, цианоза и тяжелой депрессией, до сонливости, анорексии, конъюнктивита, рвоты, водянистой диареи, ускоренного дыхания и пульса, атаксии/нарушении координации, что на поздних стадиях заболевания приводит к смерти (Gabriel et al. 2011). При АЧС генотипа II смертность составляет 100%.

Исследование показали, что клиническое течение у домашних свиней не зависит от пути инфицирования (орально-назальный, внутримышечный или в результате прямого контакта с инфицированными свиньями). При экспериментальных инфекциях не более чем в течение 10 дней смертность составила 100%. Аналогичная картина наблюдалась и при пероральном или внутримышечном заражении Европейского кабана, хотя цвет кожи и перфузии не могут быть оценены (Blome et al. 2012; Gabriel et al. 2011). У кабана выявлялась тяжелая депрессия, анорексия, диарея и респираторный дистресс-синдром преобладает.

Кроме того, в некоторых случаях до смерти наблюдались центральные нервные симптомы, включая атаксию и судороги, а также носовые кровотечения (Gabriel et al. 2011).

Как основные клинические признаки, так и патологические проявления могут значительно варьировать в зависимости от течения заболевания. Часто наблюдаемые поражения домашних свиней включают увеличенные и геморрагические гастропеченочные и почечные лимфатические узлы, спленомегалию с очагами некроза, петехии в почках, синяки, альвеолярные кровоизлияния и отеки легких (Kleiboeker 2002; Maurer & Griesemer 1958; Rodríguez et al. 1996).

Вторичные инфекции могут осложнить клиническую и патоморфологическую картину. Во время клинической фазы инфекции, вирус и вирусная ДНК могут быть обнаружены путем выделения вируса, и полимеразная цепная реакция в реальном времени

во всех секретах и экскрециях инфицированных свиней (Gabriel et al. 2011). В то время как в образцах крови обнаруживается большое количество вируса или вирусной ДНК, все образцы мазков – ректальный, глоточный, носовой и вагинальный, показывают значительно более низкое содержание вируса (Ekué et al. 1989; Gabriel et al. 2011).

В целом, инфекция АЧС сопровождается лейкопенией и тромбоцитопенией, но степень и характер может меняться в зависимости от штамма, вирулентности и хозяина.

Вирус АЧС реплицируется в первую очередь в клетках мононуклеарно-фагоцитарной системы (MPS). Взаимодействие с этими клетками является основной патогенной особенностью болезни (Mebus 1987; Mebus 1988). Однако, репликация также было показана и в других типах клеток, включая гепатоциты (Sierra et al. 1987), эндотелиальные клетки (Sierra et al. 1989; J.C. Gómez-Villamandos et al. 1995; Gomez-Villamandos et al. 1995), эпителиальные клетки почек (J C Gómez-Villamandos et al. 1995), фибробласты и клетки гладкой мышцы (Gomez-Villamandos et al. 1995).

Имуногистохимический анализ показал присутствие вирусных антигенов в мегакариоцитах (Colgrove et al. 1969), лимфоцитах (Colgrove 1968; Colgrove et al. 1969) и нейтрофилах (Fernandez, Perez, Carrasco, et al. 1992; Pérez et al. 1994; Colgrove et al. 1969; Colgrove 1968).

## **1.2. Изменения нейтрофилов под действием АЧС**

Патология нейтрофилов и всех остальных клеток иммунной системы при африканской чумы исследована недостаточно. Гематологически африканская чума свиней характеризуется нейтрофилией и присутствием незрелых форм нейтрофилов в крови (Wardley & Wilkinson 1977; Genovesi et al. 1988).

Исследования титрованием выявили взаимодействие вируса с эритроцитами, лимфоцитами и гранулоцитами, хотя эта связь не может рассматриваться как доказательство того, что эти клетки чувствительны к вирусной инфекции АЧС (Genovesi et al. 1988). Эти данные, тем не менее, привели некоторых авторов к гипотезе, что вирус АЧС размножается в лимфоцитах и нейтрофилах (Wardley & Wilkinson 1977; Colgrove et al. 1969; Colgrove 1968),

хотя другие авторы утверждали, что эти клетки не восприимчивы к инфекции (Pan 1987). Заражение нейтрофилов было подтверждено Карраско и других в 1996 году (L. Carrasco, Gómez-Villamandos, et al. 1996). Они показали, что и зрелые, и незрелые нейтрофилы зараженных свиней могут содержать вирус. Незрелые нейтрофилы зараженных свиней рассматривались авторами как транспорт для распространения вируса (Gomez-Villamandos et al. 1997). В последние годы было также показано, что вирус АЧС может реплицироваться в нейтрофилах, и в нейтрофилах у больных животных регулярно обнаруживается (Fernandez, Perez, Carrasco, et al. 1992; Ballester et al. 2010).

Наиболее подробно были исследованы количественные показатели иммунных клеток периферической крови при африканской чуме (Wardley & Wilkinson 1977). Авторами было показано, что заражение с высоко вирулентным *Kirawira* штаммом (кВт / 12) (Greig & Plowright 1970), начиная с 3-4 суток приводит к снижению количества лейкоцитов, а количество эритроцитов остается практически неизменным.

В этом исследовании число лимфоцитов уменьшилось, в то время как наблюдалось увеличение числа молодых форм нейтрофилов. Авторы полагают, что увеличение содержания нейтрофилов происходит из-за омоложения популяции и сдвига нейтрофилов влево (Greig & Plowright 1970). Регенеративные изменения в нейтрофильной формуле выражается увеличением в крови палочкоядерных и юных нейтрофилов и даже появлением метамиелоцитов и обычно при этом отмечается лейкоцитоз.

Сдвиг нейтрофилов и усиление лейкопоза - показатели раздражения костного мозга. Костный мозг, компенсируя гибель нейтрофилов в борьбе с инфекцией, отдает в кровяное русло, всё возрастающее количество недостаточно зрелых форм нейтрофилов, которые обычно не поступают в периферическую кровь. В последствии, при анализе периферической крови можно отмечать легко диагностируемое изменение популяции нейтрофилов, которые отражаются увеличением содержания юных форм нейтрофилов – сдвигом влево. Эти данные согласуются с более ранними наблюдениями Детрея и Скотта (1957) (Detray & Scott 1957). В отличие от этого, в исследованиях Гомеса Виламандоса и других (Gomez-Villamandos et al. 1997) при АЧС не наблюдалось значительных изменений в общем количестве кровяных клеток – моноцитов и тромбоцитов (Haresnape et al. 1988), но лимфопения и нейтрофилия



были описаны. Это несоответствие может возникать из слегка различных клинических процедур. Кроме того, тенденция интерпретации у авторов до некоторой степени отличается. Даже после заражения штаммом *Kirawira*, лейкопения едва достигала патологических значений.

Увеличение содержания юных форм нейтрофилов неоднократно отмечалось при острой форме АЧС (Wardley & Wilkinson 1977; Genovesi et al. 1988). Однако, как отмечали исследования, (L Carrasco, de Lara, Gómez-Villamandos, et al. 1996), действие вируса АЧС не ограничивается активизацией клеток костного мозга, и омоложением популяции нейтрофилов.

В нейтрофилах репликация вируса зависит от штамма вируса, и больше всего наблюдается на терминальной стадии болезни (Rodriguez et al. 1996). Вероятность того, что нейтрофилы могут быть заражены вирусом АЧС поддерживается иммуногистохимическими выявлениями вирусных антигенов после прививки различных штаммов, таких как *Hinde WHH* (Colgrove et al. 1969; Colgrove 1968), E70 (Fernandez, Perez, Carrasco, et al. 1992) и E75 (Fernandez, Perez, Carrasco, et al. 1992; Pérez et al. 1994) и в исследования, проведенных Казалом и другими со штаммом BA71 (Casal et al. 1984). Тем не менее, Пан в 1987 году (Pan 1987) не наблюдал *in vivo* или *in vitro* иммунофлюоресценцию нейтрофилов, что согласуется с мнением, о том, что пожилые нейтрофилы не активны в синтезе белка (Bainton et al. 1971).

Исследования с использованием умеренно вирулентного штамма АЧС из Доминиканской Республики (*ДР II*, выделен в 1979) показали, что вирус после орально-назальной инфекции обнаруживается в изолированной фракции эритроцитов, а также в плазменных и мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (Knudsen & Genovesi 1987).

В этом случае, вирусная инфекция имела лишь незначительное влияние на количество циркулирующих лейкоцитов: в начале инфекции количество нейтрофилов незначительно увеличивалось, а количество лимфоцитов – уменьшалось. В этом исследовании уже после 7 дней заражения высоковирулентным E70 штаммом АЧС наблюдалась тяжелая лейкопения. Эти результаты совпадали с уменьшением относительного числа лимфоцитов и моноцитов (Wardley & Wilkinson 1977).

Чувствительность мононуклеарных клеток к митогенным стимулам была сохранена в течение всего процесса. Последнее не согласуется с исследованиями других авторов, где наблюдались серьезные нарушения реагирования на митогенные раздражители (González et al. 1990; Wardley 1982). При АЧС некоторые авторы отмечают такие патологические изменения в нейтрофилах, как например дегрануляцию (Gomez-Villamandos et al. 1995).

### **1.3. Роль нейтрофилов в вирусных инфекциях**

Нейтрофилы – весьма подвижные фагоциты, которые участвуют в образовании раннего иммунного ответа против чужеродных патогенов. Они самые многочисленные иммунные клетки в организме высших млекопитающих (Bai et al. 2009; Le Goffic et al. 2011; McNamara et al. 2003).

Нейтрофилы были впервые описаны Ильей Мечниковым (Metchnikoff 1883). Большинство нейтрофилов находятся в костном мозгу или в иммунных органах, таких как селезенка и лимфатических узлы. Около 2% от общего числа нейтрофилов циркулируют в крови (Navarini et al. 2009). Они короткоживущие клетки, и, как правило, при благоприятных условиях живут в периферической крови несколько часов (Croker et al. 2012; Navarini et al. 2009; Savill et al. 2002). Во время инфекций, однако, их продолжительность жизни продлевается, так как нейтрофилы мигрируют из кровообращения (Colotta et al. 1992; Elbim et al. 2009).

Некоторые цитокины, вырабатываемые в очаге инфекции, такие как интерферон (IFN), фактор некроза опухоли (TNF) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), продлевают выживаемость нейтрофилов при инфекции (Colotta et al. 1992). Респираторно-синцитиальный вирус (RSV), может продлить выживание нейтрофилов, через PI3K- и NF-В-зависимый путь (Lindemans et al. 2006). Кроме того, как было показано, продолжительность жизни нейтрофилов, значительно продлевается до нескольких дней, даже если организм находится в гомеостатическом состоянии, а не под давлением инфекции или воспаления (Pillay et al. 2010).

Нейтрофилы являются одними из первых клеток, которые проникают в очаг инфекции, защищая организм от патогенов (Tumpey et al. 2005; Fujisawa 2008) или вызывая обострение заболевания (Sakai et al. 2000; Bradley et al. 2012).

Хотя функции нейтрофилов в бактериальных инфекциях были подробно описаны, их роль в вирусных инфекциях по-прежнему плохо изучена, несмотря на предыдущие исследования при респираторных вирусных инфекциях. (Larson et al. 1977; Ruutu et al. 1977; Rouse et al. 1978; Debets-Ossenkopp et al. 1982; Larson et al. 1980; Mills et al. 1981; Abramson, Lewis, et al. 1982; Abramson, Mills, et al. 1982). В последнее время проводятся все больше и больше исследований по роли нейтрофилов в вирусном патогенезе. Присутствие в периферической крови достаточного количества нейтрофилов и их наличие практически во всех органах обуславливает вероятность для этих клеток одними из первых взаимодействовать с вирусами. Ранее сообщалось о способности нейтрофилов взаимодействовать с вирусом иммунодефицита человека, вирусами гриппа и Эпштейна–Барра и была установлена индукция апоптоза нейтрофилов данными вирусами (Elbim et al. 2008; Engelich et al. 2002). Было показано, что нейтрофилы противостоят вторжению микроорганизмов фагоцитозом, производством цитотоксических компонентов, в том числе нитроксидов и свободных кислородных радикалов, а также выработыванием антимикробных пептидов и белков с хроматином, известных как нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ, NETs) (Fuchs et al. 2007; Hemmers et al. 2011; Hoshino et al. 2008; Papayannopoulos & Zychlinsky 2009; Segal 2005; Kennedy & DeLeo 2009). Нейтрофилы также способствуют воспалению при ряде патологических процессов, с помощью сложного механизма апоптоза (Kobayashi et al. 2003; Saez-Lopez et al. 2005; Savill et al. 1989) и калпротектина (S100A8 / A9) (Lusitani et al. 2003; Sohnle et al. 2000; Urban et al. 2009).

Было показано, что нейтрофилы устраняют вторгшиеся вирусные патогены через различные механизмы, которые включают (azzaq Belaouaj et al. 2000; Standish & Weiser 2009) кислород независимые и кислород-зависимые (Reeves et al. 2002; Ellson et al. 2006) пути, и нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ, NET) (Brinkmann et al. 2004). Кислород-независимый путь обеспечивается с помощью антимикробных белков, содержащихся в нейтрофильных гранулах, которые включают малые катионные белки

альфа-дефензина. Кислород-зависимый путь (также называемый окислительным взрывом), требует присутствие НАДФН и ферменты МРО.

Активированные нейтрофилы производят большое количество активных форм кислорода (АФК), которые могут быть разрушительными для вирусов. Один из путей активации нейтрофилов включает действие НАДФН-оксидаз в сочетании с выпуском протеолитических ферментов (МРО) (Fuchs et al. 2007; Nathan 2006), которые можно вызвать например при инкубации нейтрофилов с вирусом японского энцефалита (Srivastava, Sonilika Khanna et al. 1999).

Хотя было описано, что нейтрофилы выпускают  $H_2O_2$  и деградируют вирусную РНК, прямая корреляция между АФК и уничтожением ВЯЭ не установлена. Респираторный взрыв является еще одним средством, с помощью которого нейтрофилы активируются, выпуская АФК и различные латентные протеазы, хранящиеся в гранулах (Colamussi et al. 1999; Engelich et al. 2002; Tkalecivic et al. 2000). АФК активирует врожденный иммунитет не только во время бактериальных инфекций (Rada & Leto 2008), но и во время вирусных инфекций (Gonzalez-Dosal et al. 2011). Было доказано, что вирус простого герпеса (Gonzalez-Dosal et al. 2011; Hu et al. 2011) и цитомегаловирус человека (ЦМВ) (Speir et al. 1996) в фагоцитирующих клетках индуцируют продукцию АФК (Gonzalez-Dosal et al. 2011). Клетки, инфицированные респираторно-синцитиальным вирусом, (РСВ) активируют поток ионов калия и внутриклеточных АФК в ответ на выпуск каспазы-1 и ИЛ- $1\beta$  (Segovia et al. 2012). Деpletion нейтрофильных антител 1A8 выявила, что нейтрофилы имеют способность представить вирусные антигены CD8 + Т-клеткам, расположенных в костном мозгу (Duffy et al. 2012) и в легких (Hufford et al. 2012) и вызывать пролиферацию CD8 + Т клеток и секрецию IFN- $\gamma$  (Hufford et al. 2012).

Внеклеточное формирование НВЛ является другим эффективным средством для управления нейтрофилами и ликвидации инфекции через локализацию противомикробных препаратов и повышение их концентрации. Зрелые нейтрофилы способны выпускать НВЛ после активации растворимых веществ, таких как ЛПС, ИЛ-8, фторблмирилат ацетат (ФМА) (Brinkmann et al. 2004; Fuchs et al. 2007; Urban et al. 2006) или активацией Fc-рецепторов, хемокиновых, цитокиновых и Toll-подобных рецепторов (Wartha et al. 2007),

активацией вызванной тромбоцитами (Clark et al. 2007). Было показано, что формирование НВЛ не зависит от активности каспаз (Fuchs et al. 2007).

Факты указывают, что АФК является основным фактором в формировании и выпуске НВЛ (Fuchs et al. 2007; Papayannopoulos & Zychlinsky 2009). Образование АФК-зависимых НВЛ связано с внефагосомическим убийством нейтрофилов и этот процесс отличается от апоптоза и некроза (Fuchs et al. 2007). Мало известно о взаимодействиях между НВЛ и вирусами, однако, рядом авторов продемонстрирована защитная роль НВЛ при вирусных инфекциях (Saitoh et al. 2012; Jenne et al. 2013). НВЛ участвует в захвате вируса миксомы и ВИЧ-1, предотвращая их распространение в тканях хозяина. Кроме того, миелопероксидазы (МПО, другой гранулярный белок) и  $\alpha$ -дефензины, связанные с НВЛ, могут ингибировать заражаемость ВИЧ-1 (Saitoh et al. 2012). НВЛ состоит из ядерной (от мертвых или умирающих клеток) или митохондриальной хроматины (от живых клеток) (Soehnlein 2009; Yousefi et al. 2008; Yousefi et al. 2009), связанный с белком (например, миелопероксидаза и эластаза) (Brinkmann et al. 2004; Urban et al. 2006; Wartha et al. 2007). Наиболее распространенным компонентом сети являются гистоны (около 70%) (Urban et al. 2009). Роль нейтрофилов в течение инфекции гриппа может быть и защитной, и патогостимулирующей. Истощение нейтрофилов во время гриппа приводит к увеличению смертности мышей, что доказывает защитную роль нейтрофилов (Tumpey et al. 2005). Массивная инфильтрация нейтрофилов в легких во время гриппа может привести к острому легочному воспалению (Seki et al. 2010; Tate et al. 2008). Кроме того, исследования показали, что увеличение количества НВЛ вредно при хроническом воспалении легких (Marcos et al. 2010).

Активированные нейтрофилы могут выпускать гранулярные компоненты и хемокины, в том числе ИЛ-8, которые привлекают больше нейтрофилов (Nachicha et al. 1998), а также продлевают срок жизни через TNF и Fas-опосредованные рецепторы (Colotta et al. 1992). Основным компонентом азурофильных гранул нейтрофилов, является миелопероксидаза (МПО) (Segal 2005; Seo et al. 2011). МПО является провоспалительным гем ферментом, который составляет приблизительно 5% от общего белка нейтрофилов, и 25% от гранулярных белков (Segal 2005). МПО, катепсин G, и  $\alpha$ -дефензины, как было показано,

активируют клетки адаптивной иммунной системы и в конечном счете формируют иммунный ответ при инфекции (Soehnlein 2009; Soehnlein et al. 2008). А-дефензины активны против вирусов с оболочкой, и вызывают созревание дендритных клеток (Yang et al. 2009). МПО-АНЦА (анти-нейтрофилов цитоплазматические аутоантитела) индуцируют производство ИЛ-17 и играют важную роль в прогрессировании различных заболеваний, позволяя активированным нейтрофилам изменить среду, чтобы дифференцировать клетки Th17 через производство цитокинов ИЛ-6, ИЛ-17 и ИЛ- 23.

Нейтрофилы являются важными медиаторами Т-хелперов 17 (Th17) (Cua & Tato 2010). Соответственно, интерлейкин-17 (ИЛ-17) и похожие цитокины, секретируемые Th17 клетками, индуцируют медиаторы, вызывая гранулопоз и таким образом способствуют распространению и накоплению нейтрофилов. Кроме того, цитокины, такие как ИЛ-17, СХС-хемокин лиганд 8 (CXCL8, также известный как ИЛ-8), интерферон- $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), фактор некроза опухоли (ФНО) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)) обеспечивают привлечение, активацию и выживание нейтрофилов в воспалительных участках (Cua & Tato 2010). Цитокины ИЛ-23 и ИЛ-17 участвуют в привлечении нейтрофилов во время вирусных инфекций (Ferretti et al. 2003; Stark et al. 2005). Также было показано, что оба цитокина улучшают устойчивость к бактериальным и вирусным инфекциям (например, при вируса вакцини) (Kohyama et al. 2007).

Для достижения зараженной ткани из кровеносной системы нейтрофилы проходят через серию событий – прокатка, задержание, адгезия и экстравазация. Миграция нейтрофилов происходит под действием основных хемоаттрактантов таких как ИЛ-8 (Kownatzki et al. 1986; Endo et al. 1991; Mulligan et al. 1993; Broaddus et al. 1994). Кроме этого показана роль матричной металлопротеазы MMP-9, ИЛ-10 (Mutnal et al. 2010), ИЛ-6 (Fenton et al. 2002; Dienz et al. 2012) и ИЛ-1 (Schmitz et al. 2005) в регулировании миграции нейтрофилов при вирусных инфекциях.

Нейтрофилы могут взаимодействовать с зараженными клетками и/или вирионами, как только они проникают в зараженный очаг. Было показано, что нейтрофилы специфически взаимодействуют с фибробластами, зараженными респираторным синцитиальным вирусом (Van Strijp et al. 1989), и с вирус-инфицированными клетками эпителия, которые имеют

гриппозный гемагглютинин на своей поверхности (Ratcliffe et al. 1988). Позднее было определено, что молекулы CD43 на поверхности нейтрофилов, также известные как сиалофорин и Lu48 специфически связываются с вирусом гриппа (Rothwell & Wright 1994; Abramson & Hudnор 1995). Дальнейшие исследования с использованием форболмиристатацетата (PMA) или нейтрофильной эластазы (процедуры с помощью которых расщепляют CD43 от нейтрофильной поверхности) показали, что CD43 не единственная связывающая молекула. Взаимодействие между нейтрофилами и вирусом гриппа – это комплексное взаимодействие, включающее CD43, сиаловую кислоту, CD45 и вирусный гемагглютинин.

#### **1.4. Патология нейтрофилов при классической чуме свиней**

Классическая чума свиней это вирусная болезнь свиней, которая характеризуется лихорадкой, поражением кровеносных сосудов и кроветворных органов, крупозно-дифтеритическим воспалением слизистой оболочки толстых кишок. Классическая чума во многих своих иммунопатологических проявлениях похожа на африканскую чуму свиней.

Клетками-мишенями вируса классической свиной лихорадки в периферической крови, главным образом, являются моноциты, хотя в более поздних стадиях инфекции заболевания было отмечено заражение лимфоцитов, а также гранулоцитов. Миелоидные клетки являются первыми лейкоцитарными мишенями вируса классической чумы свиней (Trautwein 1988; Pauly et al. 1998; Artur Summerfield et al. 1998). Предыдущие исследования показали, что классическая чума свиней влияет на иммунную систему, вызывая обобщенную лейкопению (Trautwein 1988).

Лимфоидные органы также страдают от инфекции. Тимус и атрофия костного мозга (Cheville & Mengeling 1969; Trautwein 1988), а также обобщенное истощение лимфоцитов тоже описаны. Вирус КСФ (вируса классической свиной лихорадки) имеет особое сродство к клетками ретикулоэндотелиальной системы и обнаруживается в макрофагах, эндотелиальных и ретикулярных клетках (Coffin et al. 1996; Trautwein 1988). Предыдущие исследование описали не только лейкопению, но и В-лимфопения и увеличение

сегментоядерных нейтрофилов в периферийной крови (Susa et al. 1992). В одном из исследований, в отличие от лимфоцитов, абсолютное число миелоидных клеток в периферической крови животных, инфицированных вирусом классической чумы свиней, были относительно стабильным. За счет уменьшения числа лимфоцитов миелоидные клетки стали доминировать в крови зараженных свиней. Авторы предполагают, что, вполне возможно, что начальная инфекция гранулоцитов *in vivo* будет происходить в незрелых миелоидных бластах. Но они будут по-прежнему дифференцироваться в зрелые гранулоциты, сохраняя при этом выражение вирусного антигена (A. Summerfield et al. 1998).

В исследованиях тридцать свиноматок возрастом 4 месяца, были инфицированы классической чумой свиней, штаммом «*Alfort*» для того, чтобы определить механизм, ответственный за лимфопению и тромбоцитопению, наблюдаемой в селезенке при экспериментальной индукции болезни с помощью иммуногистохимических и ультраструктурных методов. Результаты показали, что, начиная с 4 дни до конца болезни наблюдалось снижение уровня лейкоцитов (до  $2 \times 10^6$  лейкоцитов / мл), особенно лимфоцитов в крови (нормальное значение у здоровых животных  $13 \times 10^6$  клеток / мл). Лимфопения сопровождалась нейтропенией, хотя было показано увеличение числа палочкоядерных нейтрофилов с 4 дни. Количество моноцитов, эозинофилов, базофилов и не показал существенных изменений (Sanchez-Cordon et al. 2005). Другими авторами было исследовано гистологическая, ультраструктурная и иммуногистохимическая патология тонкой кишки при классической чумы. Было выявлено что во всех областях кишечника присутствуют апоптотические нейтрофилы, которые характеризуются конденсацией и маргинацией хроматина и фрагментацией нейтрофильных ядер и цитоплазмы. Мембраносвязанные фрагменты образуют апоптотические тела (Sánchez-Cordón et al. 2003). Исследовалось еще и хронологическое развитие поражений в костном мозгу свиней, зараженных КЧС.

Заметное и статистически значимое снижение общего числа клеток белой крови – лимфопения, панцитопения и нейтропения, наблюдалось с 4 дни, хотя было также выявлено значимое увеличение числа палочкоядерных нейтрофилов и метамиелоцитов, начиная с 6 дни. Количество эозинофилов осталось неизменным. Начиная с 6 дни, почти всегда



наблюдался эмперипоз нейтрофилов в цитоплазме мегакариоцитов. Что касается морфологических изменений миелоидных клеток, то, начиная с 2 до 6 дни, наблюдалось истощение клеток миелоидного ряда, которые были оценены с помощью иммуноцитохимического подсчета клеток с использованием MAC-387. После 6 дни истощение клеток было снижено, что совпало с увеличением числа митозов в этой популяции клеток. Это увеличение связано с ростом числа нейтрофилов; все этапы развития которых отчетливо наблюдались.

Иммуноцитохимический анализ обнаружил gp55 антиген со 2 дни и выявил инфекцию миелоидных клеток, особенно моноцитов. Скорость инфекции выросла с 10% (2 дни) до 40-50% (6 дни).

Электронная микроскопия показала присутствие инфицированных промоноцитов, моноцитов, а также промиелоцитов, метамиелоцитов и нейтрофильных миелоцитов (Gomez-Villamandos et al. 2003). Относительное увеличение числа миелоидных клеток при развитии заболевания было показано еще и в другом исследовании (Artur Summerfield et al. 1998).

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Субъекты и объекты исследования

В качестве экспериментальной модели использовали 18 свиней породы ландрас возрастом от 3 до 4 месяцев и весом 35-40 кг. 14 свиней заражали подкожным введением вируса АЧС, а контролем служили 4 свиньи того же возраста и веса.

Порода ландрас была получена в Дании в начале 20 века, селекцией местных пород с крупной белой английской свиньей, при белковом рационе кормления. Это порода широко распространена по всей территории Армении, и широко используется в свиноводстве.

На последней стадии (7 дни) животных умерщвляли. Эвтаназия свиней проводилась согласно Guide for the Care and Use of laboratory Animals, AVMA Guidelines протоколу (Clark et al. 1996).

Морфофизиологические исследования проводились на мазках клеток периферической крови, костного мозга и ПККМ.

#### 2.2. Вирус и модель африканской чумы свиней

Для инфицирования применяли вирус АЧС (генотип II), который был выделен из селезенки и печени искусственно зараженных свиней. Для исследований изготавливали мазки из свежесобранной периферической крови, которые были взяты из глазного синуса и отпечатки костного мозга, взятые из распила бедренной кости. Цельная кровь подвергалась также биохимическим исследованиям, которые описаны ниже.

#### 2.3. Титрация и определение дозы вируса

Титрация и определение дозы вируса проводилось рутинным методом гемадсорбирующих единиц, согласно Энхуанес (Enjuanes et al. 1977). Используемая доза вируса АЧС определялась в лаборатории до начала эксперимента и была равна  $10^4$  гемадсорбирующих единиц – ГАЕ<sub>50/мл</sub>.

## 2.4. Приготовление исследуемых образцов

С целью изучения были изготовлены стандартные мазки крови на предметных стеклах. Свежесобранная периферическая кровь была взята из глазного венозного синуса (Stier & Leucht 1980) ежедневно в одно и то же время у свиней, предварительно (за 1 сутки до забора крови) зараженных вирусом АЧС.

Помимо этого, отпечатки красного костного мозга этих же свиней были взяты на 2, 3, 4, 5, 6 и 7 дни после инфицирования (дпи). Аналогичным образом готовили мазки и отпечатки здоровых свиней. Фиксирование мазок проводилось в этиловом спирте (96°) в течение 30 мин.

Отпечатки костного мозга брались при аутопсии свиней, а мазки крови – в динамике заболевания ежедневно. Кроме этого, для проведения биохимических анализов собиралась цельная кровь, (со 2-го по 7-й дни).

## 2.5. Морфологический анализ клеток

Морфологический анализ и состав нейтрофилов крови проводили на мазках, которые были окрашены гематоксилин-эозином по Романовскому-Гимза (Ромейс et al. 1953).

Определяли состав всех морфологически выявляемых клеток периферической крови, костного мозга и ПККМ их процентное соотношение, число мертвых клеток среди них. В последнее время появилось несколько различных классификаций миелоидных клеток. В наших исследованиях мы используем классическую терминологию, однако для удобства восприятия приводим более современную классификацию (Weiss & Wardrop 2011). Во всех морфофизиологических исследованиях миелоидные клетки были разделены на следующие популяции: миелобласты, промиелоциты, метамиелоциты, палочкоядерные нейтрофилы, сегментоядерные нейтрофилы.

При исследовании костного мозга, кроме количества подсчитанных клеток, рассчитывается также соотношения между молодыми и зрелыми формами миелоцитов. Этот индекс называется костномозговым индексом созревания нейтрофилов (КМИСН) и определяется по формуле: 
$$\text{КМИСН} = \frac{\text{промиелоциты} + \text{миелоциты} + \text{метамиелоциты}}{\text{палочкоядерные} + \text{сегментоядерные нейтрофилы}}$$

Для более глубокого изучения морфологического анализа клеток определялся также индекс сдвига нейтрофилов (ИСН, индекс сдвига — ИС), которое выражает соотношение молодых форм нейтрофилов к зрелым. Индекс сдвига нейтрофилов рассчитывается по формуле:

$$\text{ИС} = \frac{(\text{МЭ} + \text{ПМ} + \text{ММ} + \text{П})}{\text{С}},$$

где МЭ — миелобласты, М — промиелоциты, ММ — метамиелоциты, П — палочкоядерные нейтрофилы, С — сегментоядерные нейтрофилы (Воробьева et al. 2002).

Для морфофизиологического исследования в каждом случае, для каждой популяции клеток исследовалось не менее 1500 клеток. Подсчет миелограммы костного мозга проводили на основе анализа всех клеток костного мозга в 75 полях зрения. Затем оценивали клеточность костного мозга (нормо-, гипо- и гиперклеточный) и давали характеристику всех клеточных популяций.

Все размеры изученных клеток и их структур (клетка, цитоплазма, ядрышко) даны в  $\text{мкм}^2$ .

## **2.6. Окраска ДНК по Фельгену и цитофотометрия ДНК**

Для цитохимических исследований зафиксированные на предметном стекле препараты одновременно окрашивали реактивом Шиффа по Фельгену. Гидролиз ДНК проводили в 5N HCl в течение 1 часа при  $t = 22^{\circ}\text{C}$ . К

Количественное определение комплекса ДНК-фуксин, площади ядер и ядрышек всех исследуемых форм эритроидных клеток на мазках периферической крови и отпечатках костного мозга в контроле и при воздействии вируса АЧС производили при длине волны 575 нм с визуализацией изображения (увеличение 100x1.30), созданном на базе микроскопа-фотометра SMP 05 (OPTON, ФРГ) оснащенного компьютером.

В каждом случае производили измерения в 100 ядрах. Вычисляли среднее содержание ДНК в ядре и ядрышках (в условно сравнимых единицах), определяли площадь ядер и ядрышек и высчитывали среднее число ядрышек на ядро. На основании полученного материала по содержанию ДНК в ядрах строились гистограммы их распределения по

классам ploидности. Для их построения определяли стандартное диплоидное количество ДНК в ядрах лимфоцитов периферической крови здоровых свиней, которое строго соответствует содержанию ДНК в диплоидной популяции в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла.

## 2.7. Окраска РНК галлоцианин-хромовыми квасцами

Для количественного анализа содержания РНК и размеров миелоидных клеток мазки периферической крови одновременно окрашивали комплексом галлоцианин-хромовыми квасцами (ГХК) по Киферу и Зандриттеру, использовали 98%+ галлоцианин фирмы “Aldrich” в течение 48 часов в свежеприготовленном растворе на основе ГХК (Kiefer 1970).

Для количественного анализа содержания РНК и размеров ядрышек, ядер, цитоплазмы и клетки в целом использовалась стандартная программа открытого доступа ImageJ, которая позволила определить в одной и той же клетке площадь цитоплазмы, ядра и ядрышек, а также содержание в них РНК. Содержание РНК даны в условных единицах.

## 2.8. Статистическая обработка

Полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки “Microsoft Excel” версия 13.0 с использованием раздела программы “Анализ данных”, подраздела “Описательная статистика”. В каждой группе для всех признаков вычисляли среднее арифметическое, стандартное отклонение и среднюю ошибку среднего арифметического.

Достоверность различия между средними значениями определяли по t-Критерию Стьюдента, по формуле:

$$t = \frac{M_d}{s_d / \sqrt{n}},$$

где где M<sub>d</sub>— средняя разность значений, s<sub>d</sub> — стандартное отклонение разностей, а n — количество наблюдений.

При непараметрическом распределении признаков, использовался u-критерий Вилкоксона-Манн-Уитни, с помощью программы SPSS 10.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Корреляцию между изучаемыми показателями определяли в программе “Excel” при помощи коэффициента корреляции по Пирсону –  $r$ . Ошибку коэффициента корреляции определяли по формуле:

$$mr = \frac{\pm 1 - r^2}{n},$$

где  $n$  – число наблюдений,  $r$  – коэффициент корреляции. Ошибка не должна превышать 1/3 значения коэффициента корреляции.

При значении  $r$  до 0,3 корреляционная связь считается слабой, от 0,3 до 0,6 – средней, при 0,6 и выше – сильной. Знак «-» означает обратную корреляционную зависимость.

## **2.9. Определение концентрации ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ в плазме крови.**

Уровни ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ в образцах плазмы измеряли с помощью стандартного метода твердофазного иммуноферментного анализа ELISA согласно инструкции производителя («Набор для определения свиного ЭПО»: MyBioSource; ELISA Kit; MBS074889, MBS085451, MBS2883535, MBS743172).

Определение ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ проводилось в сыворотке периферической крови 4 здоровых и 18 инфицированных вирусом АЧС свиней. Около 4 мл крови брали из глазной вены всех участвующих в опыте свиней. Отделение сыворотки для ИФА реакции осуществлялось путем осаждения форменных элементов крови. До проведения иммуноферментной реакции сыворотки хранили при температуре  $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$  как контрольных, так и подопытных животных. Максимальный срок хранения сывороток 14 дней.

Чтобы определить количество ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ использовался стандартный метод ELISA. Антитела ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ определяли набором фирмы MyBioSource (США) методом ELISA, основанном на классической твердофазной иммуноферментной технике.

На первом этапе образцы с антителами к ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ вносили в лунки с нанесенным на дно антигеном; после получасовой инкубации, в процессе которой происходит связывание комплекса антиген-антитело, несвязавшиеся компоненты удаляли

отмыванием. На втором этапе в лунки прибавляли конъюгат, состоящий из кроличьих анти-IgG антител человека с пероксидазой, который образует типичный иммунный комплекс со специфическими антителами ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ свиньи. Отмыванием удаляли остатки конъюгата и вносили в лунки ТМВ/субстрат, который окрашивает образовавшийся иммунный комплекс в голубой, а после добавления стоп-реагента – в желтый цвет. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации – ИЛ-17, ИЛ-23, Г-КСФ и ГМКСФ антител в исследуемых образцах. Концентрация изученных цитокинов дана в пкг/мл.

## ГЛАВА 3

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. ПАТОГЕНЕЗ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ СВИНЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ ОСТРОЙ ФОРМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ

##### 3.1.1. Популяционный анализ миелоидных клеток периферической крови свиней в контроле и в динамике острой формы африканской чумы

Хорошо известна важность исследования количественного и качественного состава клеточных элементов системы кроветворения, и, в частности, популяции миелоидных клеток периферической крови, которые, являясь доступными и важными индикаторами нарушений в системе кроветворения и функционирования форменных элементов крови, позволяют обнаружить их изменения при определенных патологических состояниях (Zhou et al. 2009; Сароян 2015).

Отсюда и важность популяционного анализа миелоидных клеток. Анализ основных клеток крови, представленный в таблице 1 (Каралова et al. 2012). Анализ показал, что большую часть лейкоцитов периферической крови здоровых свиней (около 55%) составляют лимфоциты, а на палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы в сумме приходится примерно 35% популяции лейкоцитов.

Полученные данные хорошо согласуются с данными литературы (Любин & Конова 2005), по которым соотношение лимфоцитов к нейтрофилам достигает 1.8, а по нашим данным в норме это соотношение достигает 1.65%. Уже с 1 дни болезни количество нейтрофилов в периферической крови уменьшается на 22%, а, начиная с 4 дни и вплоть до терминальной стадии, оно в среднем падает на 60%. Как видно из таблицы, в контроле мертвые клетки не были выявлены, но, начиная с 1 дни, они появляются в периферической крови свиней и к терминальной стадии составляют чуть меньше половины популяции всех клеток крови. При этом серьезные изменения претерпевает и состав нейтрофилов периферической крови, представленный в таблице 2, в которой даются данные по



распределению миелоидных клеток по степени зрелости в периферической крови свиней при острой форме африканской чумы.

Выше было показано, что в периферической крови здоровых свиней нейтрофилы представлены, в основном, сегментоядерными и палочкоядерными клетками. Последние составляют не более 8% нейтрофилов периферической крови здоровых свиней (таблица 2). В крови встречаются в незначительном количестве и юные формы (метамиелоциты составляют менее 1% популяции нейтрофилов периферической крови здоровых свиней).

Уже с первых суток наблюдается уменьшение числа сегментоядерных нейтрофилов на 17.0%, а число палочкоядерных нейтрофилов увеличивается на 40%, в то время как количество метамиелоцитов увеличивается более чем в 6 раз, впервые появляются промиелоциты, число которых приближается к 2.0%. На 2 дни количество сегментоядерных нейтрофилов, продолжает уменьшаться и к терминальной стадии сравнивая с контролем становится более чем в 3 раза меньше. При этом процент палочкоядерных нейтрофилов вплоть до 5 дни плавно повышается и на 5 дни в 4 раза превосходит их количество по сравнению с контролем.

В дальнейшем, к терминальной стадии болезни их процент несколько уменьшается, хотя продолжает превосходить их количество по сравнению с контролем на 2.5 раза. В то же время число метамиелоцитов на всем протяжении заболевания значительно возрастает и к завершающей стадии болезни составляет около трети всей миелоидной популяции в периферической крови. Наиболее ранние, морфологически распознаваемые формы миелоидных клеток, а именно промиелоциты и миелобласты, которые не встречаются в периферической крови здоровых свиней, появляются в незначительном количестве уже на 1 дни, а затем, плавно увеличиваясь, к концу болезни суммарно составляют около 20% от всей популяции миелоидных клеток крови. На рисунке 1 представлены все морфологически дифференцируемые клетки миелоидного ряда, которые нами были обнаружены в периферической крови здоровых и больных африканской чумой свиней.

Кроме сегментоядерных (4a) и палочкоядерных (3) нейтрофилов в периферической крови больных свиней присутствовали метамиелоциты (2b), промиелоциты (2a) и миелобласты (1).

Таблица 1.

Популяционный анализ основных ядерных форм клеток периферической крови свиней в норме и при африканской чуме (в %).

Типы клеток	Контроль	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Лимфоциты	53.5±5.1	40.8±3.1*	37.2±3.1*	34.3±2.5*	31.1±2.1*	29.7±2.6*	27.4±2.4*	22.7±2.2*
Моноциты	10.2±1.5	13.6±2.3	16.0±1.5**	17.2±1.7**	18.3±2.5**	17.3±1.5**	16.1±1.1**	10.8±0.8
Миелоидные клетки	34.7±3.9	27.1±2.6	20.5±1.9*	19.5±2.0*	14.4±1.2*	14.7±1.4*	14.6±1.3*	12.3±1.4*
Эозин-базофилы	1.6±0.4	4.3±1.2**	3.5±0.3**	3.6±0.7**	2.8±0.4**	3.6±0.4**	3.7±0.3**	2.9±0.2**
Эритробласт	0.0	8.0±0.9**	13.0±0.7**	12.5±1.3**	11.9±1.6**	10.9±1.4**	9.5±2.0**	6.1±1.0**
Разрушенные	0.0	6.2±0.7**	9.8±1.1**	12.9±1.2**	21.6±2.8**	23.8±3.1**	28.7±3.4**	45.2±4.8**

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

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

Таблица 2.

Распределение миелоидных клеток по степени зрелости в периферической крови свиней при острой форме африканской чумы (%).

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

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

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

Кроме нормальных форм были выявлены и патологические формы нейтрофилов. Это гигантские (7, 8) и гиперсегментированные (шесть и более сегментов) нейтрофилы (4b), вакуолизированные (5a) и деградирующие нейтрофилы (11, 12a).

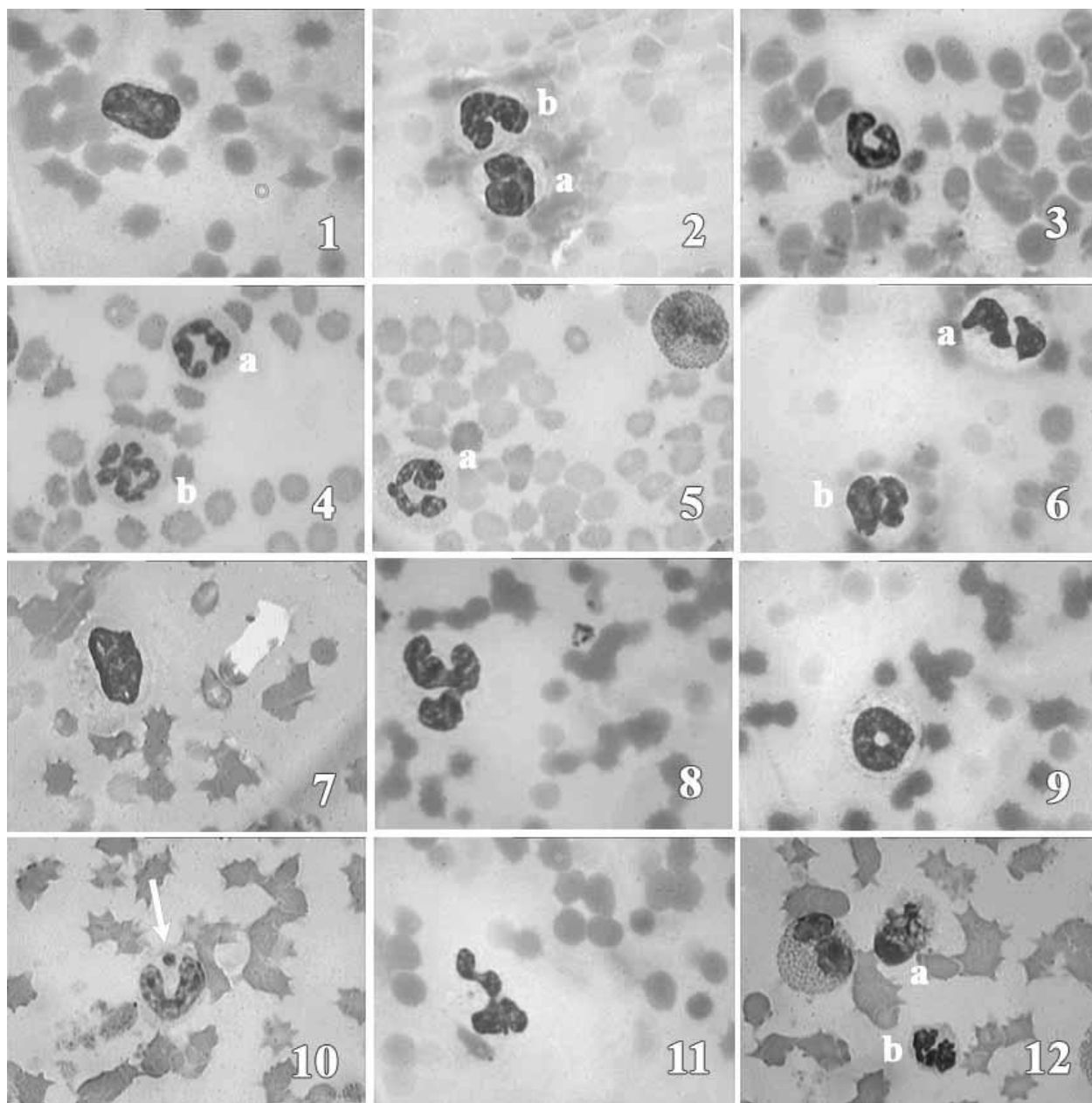


Рисунок 1. Клетки миелоидного ряда периферической крови свиней в норме и при АЧС. 1. Миелобласт, 2. а. Промиелоцит, б. Метамиелоцит, 3. Палочкоядерный нейтрофил, 4. а. Нормальный сегментоядерный нейтрофил, б. Гиперсегментированный нейтрофил, 5. а. Вакуолизированный нейтрофил, 6. а., б. Бисегментные нейтрофилы, 7. и 8. Гигантский промиелоцит и сегментоядерный нейтрофил, 9. Патологичный палочкоядерный нейтрофил, 10. Палочкоядерный нейтрофил с дополнительным ядром, 11. Кариолизис гигантского нейтрофила, 12. а. Разрушающийся нейтрофил, б. Патологичный сегментоядерный нейтрофил.

Таким образом, нейтрофилия, описанная рядом авторов (Wardley & Wilkinson 1977), несмотря на значительное повышение содержания незрелых форм, в наших экспериментах не наблюдалась, вероятнее всего из-за снижения общего числа клеток нейтрофильного ряда. Анализ изменений в популяции нейтрофилов при АЧС выявил значительный сдвиг влево. Появляются метамиелоциты, процент которых в периферической крови, имеет тенденцию к росту на протяжении всего заболевания, и к терминальной стадии болезни достигает 10% популяции.

Анализ изменений в популяции нейтрофилов при африканской чумы выявил значительный сдвиг влево. Появляются метамиелоциты, процент которых в периферической крови, имеет тенденцию к росту на протяжении всего заболевания, и к терминальной стадии болезни достигает 10% популяции. В норме соотношение палочкоядерных/сегментоядерных нейтрофилов составляло примерно 0.3.

Изменение соотношения палочкоядерных/сегментоядерных нейтрофилов наблюдается уже к концу первых суток после инфицирования, возрастая вдвое и достигая 0.65, однако достоверная разница с контролем проявляется к 48 часам после инфекции, когда начинает наблюдаться инверсия соотношения палочкоядерных/сегментоядерных нейтрофилов с преобладанием палочковидных форм нейтрофилов (1.5% - 3.5% в зависимости от срока болезни).

Инверсия соотношения палочкоядерных/сегментоядерных нейтрофилов, достигая пика к 4 дни, сохраняется вплоть до терминальной фазы заболевания, графическое представление чего будет представлено ниже – вместе с данными костного мозга.

### **3.1.2. Динамика изменений площади и содержания РНК в миелоидных клетках периферической крови в процессе острой формы африканской чумы свиней**

Известно, что в периферической крови здоровых свиней ранние формы миелоидных клеток отсутствуют и лишь незначительный процент составляют метамиелоциты (Любин & Конова 2005) и соотношение палочкоядерных нейтрофилов к сегментоядерным не превышает 0.3.

По нашим данным представлены вверху подавляющее число (более 94%) составляют палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, соотношение которых друг к другу достигает 0.24. Начиная с первых суток заболевания количество нейтрофилов в периферической крови падает, но при этом общее число популяции миелоидных клеток в крови уменьшается недостоверно.

Из таблицы 3 видно, что размерные показатели, как ядра, так и цитоплазмы палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в контроле почти не отличаются друг от друга. Метамиелоциты, которые составляют незначительный процент миелоидных клеток периферической крови здоровых свиней, недостоверно крупнее нейтрофилов. С первых суток размеры нейтрофилов и метамиелоцитов недостоверно уменьшаются и появляются в небольшом количестве промиелоциты, а со вторых суток обнаруживаются миелобласты – самые крупные клетки миелоидного ряда в периферической крови больных свиней (таблица 3). Размеры цитоплазмы, ядра, и ядрышек последних на всем протяжении заболевания значительно, но недостоверно уменьшаются. Промиеоциты с первых суток болезни плавно, но недостоверно увеличиваются как в размерах, так и в количестве, а на метамиелоциты в терминальной стадии приходится около половины всей популяции миелоидных клеток крови и, хотя размеры их ядер и цитоплазмы недостоверно увеличиваются, размеры их ядрышек, недостоверно уменьшаясь к завершающей стадии оказываются более чем в 2.5 раза меньше, чем в контроле. Площадь цитоплазмы и ядра палочкоядерных нейтрофилов вплоть до шестых суток увеличивается незначительно, размеры их ядрышек недостоверно уменьшаясь к завершающей стадии оказываются более чем в 2.5 раза меньше, чем в контроле.

Возможно, это связано с увеличением на последних стадиях болезни числа гигантских палочкоядерных нейтрофилов, что вероятно отражается на средней площади последних. Последние встречаются со 2 дни и вплоть до терминальной стадии болезни, но их число не превышает 2% популяции миелоидных клеток, а количество гиперсегментированных нейтрофилов несколько выше, но не достигает 3%.

Как видно из таблицы 4, содержание РНК в ядре и цитоплазме нейтрофилов периферической крови на всем протяжении болезни вплоть до терминальной стадии по сравнению с контролем меняется незначительно.

Таблица 3.

Динамика изменений площади миелоидных клеток периферической крови при острой форме африканской чумы свиней (мкм<sup>2</sup>).

Типы клеток	Структура	Контроль	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Миелобласты	Цитоплазма	-	-	166.3±27.8	156±20.0	123.2±23.3	112.3±35.6	116.3±4.6	114.1±5.6
	Ядро	-	-	94.3±32.0	78.2±17.4	72.1±16.2	78.2±27.3	69.7±8.1	54.3±9.9
	Ядрышко	-	-	6.4±1.7	6.4±1.5	5.8±0.8	4.9±0.8	4.1±1.1	3.1±0.5
Промиелоциты	Цитоплазма	-	58.9±9.0	78.8±9.9	120.2±12.8**	125.1±11.8**	122.6±10.0**	129.4±12.3**	121.8±21.3**
	Ядро	-	39.5±6.0	45.6±2.3	65.9±13.4	66.4±9.1	73.2±3.5**	77.9±6.8**	74.1±9.8**
	Ядрышко	-	3.0±0.5	2.6±0.2	4.0±0.2	4.3±0.6	4.6±0.5	5.5±0.7	5.6±0.8
Метамиелоциты	Цитоплазма	118.6±5.2	102.2±14.3	111.3±8.0	112.5±5.7	126.4±9.5	130.1±7.2	135.2±7.3 <sup>a</sup>	130.8±8.2
	Ядро	72.6±8.3	53.7±6.5	50.5±8.1	42.2±3.8	45.0±3.6	68.8±3.1	67.7±3.3	61.7±2.8
	Ядрышко	7.8±3.3	3.6±0.4	3.3±0.5	2.8±0.3	2.8±0.3	3.8±0.4	4.2±1.3	3.2±0.3
Палочкоядерные Нейтрофилы	Цитоплазма	104.4±11.0	94.4±7.2	107.5±7.2	114.1±5.0	111.6±5.4	112.2±5.9	112.0±0.4	134.8±5.6 <sup>a</sup>
	Ядро	50.4±3.9	31.7±2.5	40.9±5.6	43.6±2.4	53.5±2.8	60.5±3.5	61.2±2.9	62.4±6.7 <sup>a</sup>
Сегментоядерные Нейтрофилы	Цитоплазма	104.3±3.8	89.8±4.0*	94.8±19.9	115.6±6.6	114.2±11.3	102.9±30.0	105.2±15.8	104.6±18.1
	Ядро	55.2±2.2	30.5±1.5*	39.9±6.6	42.3±3.4	52.7±1.8	52.1±11.2.0	51.8±9.7	49.2±9.2

\* достоверно ниже по сравнению с контролем (p&lt;0.05-0.01)

\*\* достоверно выше по сравнению с 1 дни (p&lt;0.05-0.01)

<sup>a</sup> тенденция (p<0.1)

При этом недостоверно отличаясь друг от друга. Аналогичная картина наблюдается и с метамиелоцитами, но при этом выявляется незначительная тенденция к повышению площади цитоплазмы и уменьшению площади ядра и ядрышек.

Содержание РНК в промиелоцитах, которые появляются в периферической крови в небольшом количестве на первые сутки заболевания, достоверно превышает его количество в цитоплазме, ядре и ядрышках промиелоцитов уже к третьим суткам болезни и эта тенденция сохраняется до конца заболевания. Содержание РНК в миелобластах, которые оказались самыми ранними из обнаруженных на вторые сутки болезни миелоидных клеток, имеет тенденцию к уменьшению количества РНК во всех клеточных структурах миелобластов на протяжении заболевания.

Из всего выше сказанного можно сделать вывод, что болезнь вызывает не только резкое омоложение клеток миелоидного ряда, вплоть до появления самых молодых из распознаваемых визуально миелобластов, но и недостоверное уменьшение площади и содержания РНК в них, что возможно связано с вынужденным выбросом из костного мозга не закончивших созревание миелобластов.

В то же время, во всех структурах промиелоцитов размеры цитоплазмы и содержание РНК на всем протяжении заболевания вплоть до терминальной стадии значительно увеличиваются, а в метамиелоцитах и нейтрофилах сохраняется тенденция к незначительному увеличению, как размеров, так и содержания РНК в их структурах. При сравнении изменений площадей исследуемых клеток и содержания в их структурах РНК оказалось, что они прямо пропорциональны.

Таблица 4.

Динамика изменений содержания РНК в миелоидных клетках периферической крови при острой форме африканской чумы свиней (у.е.)

Типы клеток	Структура	Контроль	1 дни	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Миелобласты	Цитоплазма	-	-	117.6±19.2	115.3±12.5	102.5±19.5	108.1±27.2	106.1±2.3	84.2±5.3*
	Ядро	-	-	85.6±26.6	82.6±14.9	80.5±12.5	79.9±21.0	78.3±9.9	63.9±6.3*
	Ядрышко	-	-	6.5±1.7	8.0±1.3	6.7±0.9	6.5±0.5	5.2±1.2	4.4±0.4
Промиелоциты	Цитоплазма	-	46.1±6.9	58.0±6.8	97.2±10.9	102.8±9.1	100.1±7.2	107.6±8.3	89.0±14.8**
	Ядро	-	50.6±5.9	50.4±1.5	68.2±9.9	75.8±8.9	76.2±3.0	82.6±3.8	77.6±5.8**
	Ядрышко	-	4.5±0.5	4.1±0.3	5.7±0.3	6.1±0.6	6.3±0.5	6.7±0.7	6.8±0.6
Метамиелоциты	Цитоплазма	85.2±3.9	77.5±10.4	80.6±5.5	82.3±4.6	93.9±7.0	89.3±5.2	91.2±4.9	95.3±5.4
	Ядро	79.6±9.0	48.7±5.8	53.7±6.3	50.7±3.3	63.1±3.7	71.8±2.4	76.4±2.7	70.8±2.0
	Ядрышко	10.0±4.2	4.2±0.4	4.2±0.4	4.4±0.3	5.5±0.6	5.7±0.4	8.5±6.2	5.7±0.3
Палочкоядерные Нейтрофилы	Цитоплазма	74.8±7.8	68.6±5.0	79.1±5.3	86.6±3.3	98.1±4.1	94.3±4.2	102.2±18.6**	99.6±3.1
	Ядро	61.0±2.8	43.7±5.8	47.8±4.6	55.3±2.1	71.8±2.5	68.7±2.9	99.0±1.2**	72.2±5.8
Сегментоядерные нейтрофилы	Цитоплазма	77.2±2.8	61.8±2.9	70.1±4.5	84.6±4.9	91.8±7.6	87.7±22.8	85.2±12.8	78.9±11.6
	Ядро	66.9±1.9	41.5±1.4*	37.6±3.3*	52.3±3.4 <sup>a</sup>	61.6±2.4	55.0±11.1	56.5±9.5	58.7±9.2

\*достоверно ниже по сравнению со 2 дни и/или с контролем (p&lt;0.05-0.01)

\*\*достоверно выше по сравнению со 2 дни и/или с контролем (p&lt;0.05-0.01)

<sup>a</sup>тенденция (p<0.1)



### **3.1.3. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток периферической крови при острой форме АЧС**

Известно, что все ядерные формы клеток периферической крови млекопитающих, и в том числе здоровых свиней, терминально дифференцированы и диплоидны.

Исследования популяционного состава периферической крови здоровых свиней показали, что в нем, практически, отсутствуют незрелые формы гемопоэтических клеток. Количество метамиелоцитов не превышает 1.0%, но уже с первых дней болезни их число резко возрастает, и появляются промиелоциты. На рисунке 2 приведены данные по содержанию ДНК в ядрах ранних форм лейкоцитов свиней при АЧС, которое представлено нами в виде динамики изменений распределения ядер ранних миелоидных клеток по классам плоидности.

На рисунках 2А-2Ж приведена динамика изменений в распределениях ядер миелоидных клеток по классам плоидности. В 1 дни миелоидная популяция представлена диплоидными гипердиплоидными и тетраплоидными клетками. В дальнейшем, доля гипердиплоидных ядер снижается, и к 7 дни они полностью исчезают, и популяция ранних миелобластов представлена только диплоидными клетками.

На рисунке 3А-3З приведена динамика изменений в распределении ядер нейтрофилов по классам плоидности. На гистограммах палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы представлены суммарно в виду того, что их ядра мало отличаются друг от друга по содержанию ДНК.

Как следует из рисунка все нейтрофилы в контроле диплоидны (3А), однако на 1 и 2 дни в популяции появляются в небольшом количестве гипердиплоидные клетки. С увеличением сроков заболевания на 3, 4, 5, 6 и 7 дни последние полностью исчезают, и вся популяция нейтрофилов представлена диплоидными клетками и появляются в небольшом количестве гиподиплоидные диплоидными клетками появляются в небольшом количестве гиподиплоидные нейтрофилы, что свидетельствует о гибели части нейтрофилов на завершающих стадиях болезни. Как и следовало ожидать, определение среднего содержания ДНК выявило, что все дифференцированные клетки белой крови свиней диплоидны и лишь

небольшой процент приходится на триплоидные клетки, причем они встречаются не на всех стадиях развития болезни.

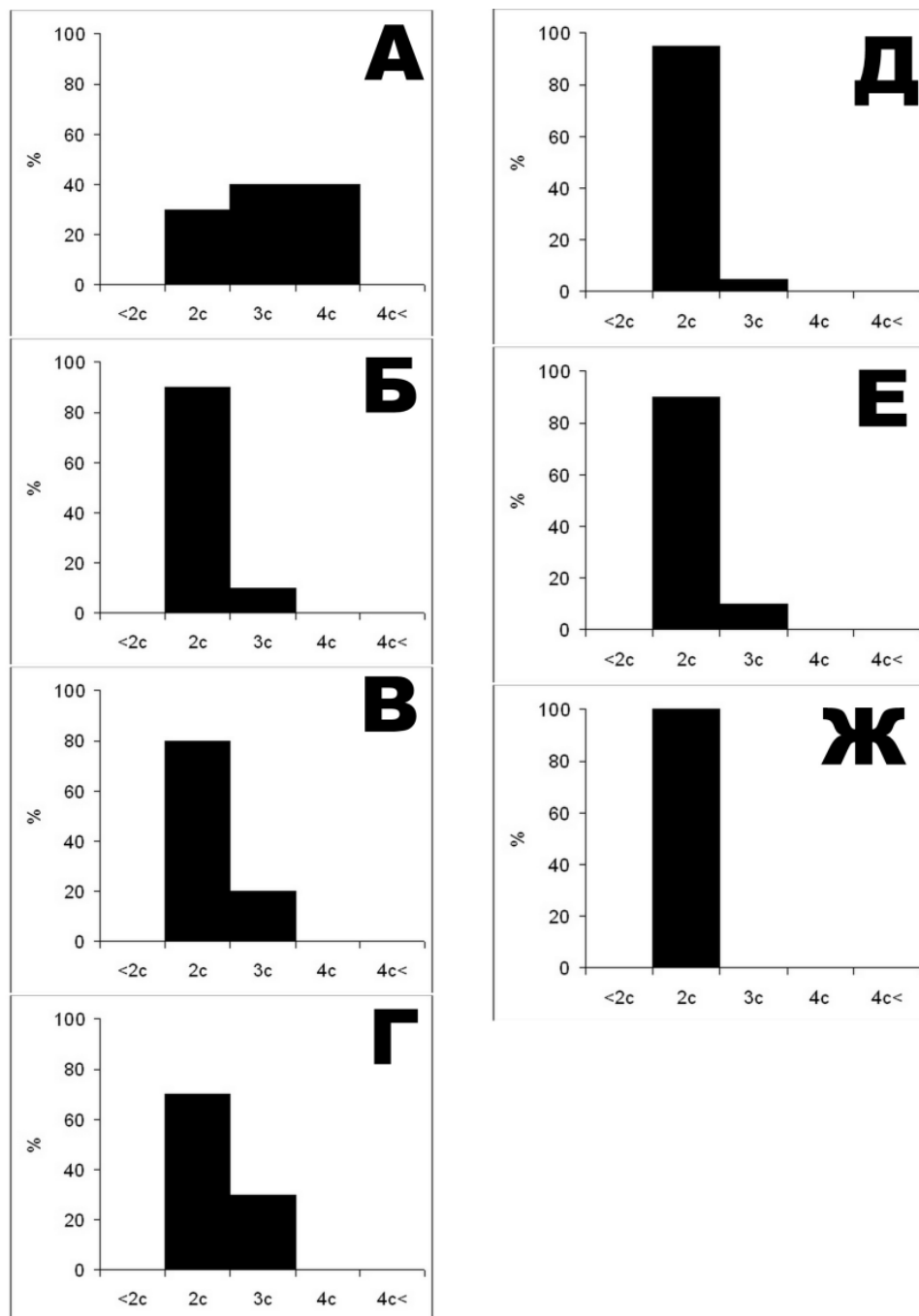


Рисунок 2. Распределение ядер ранних миелоидных клеток (суммарно) периферической крови свиней по классам плоидности в динамике острой формы АЧС.

*По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”*

*По оси ординат – частота встречаемости*

*А. – 1 дни, Б. – 2 дни, В – 3 дни, Г–4 дни, Д –5 дни, Е –6 дни, Ж –7 дни.*

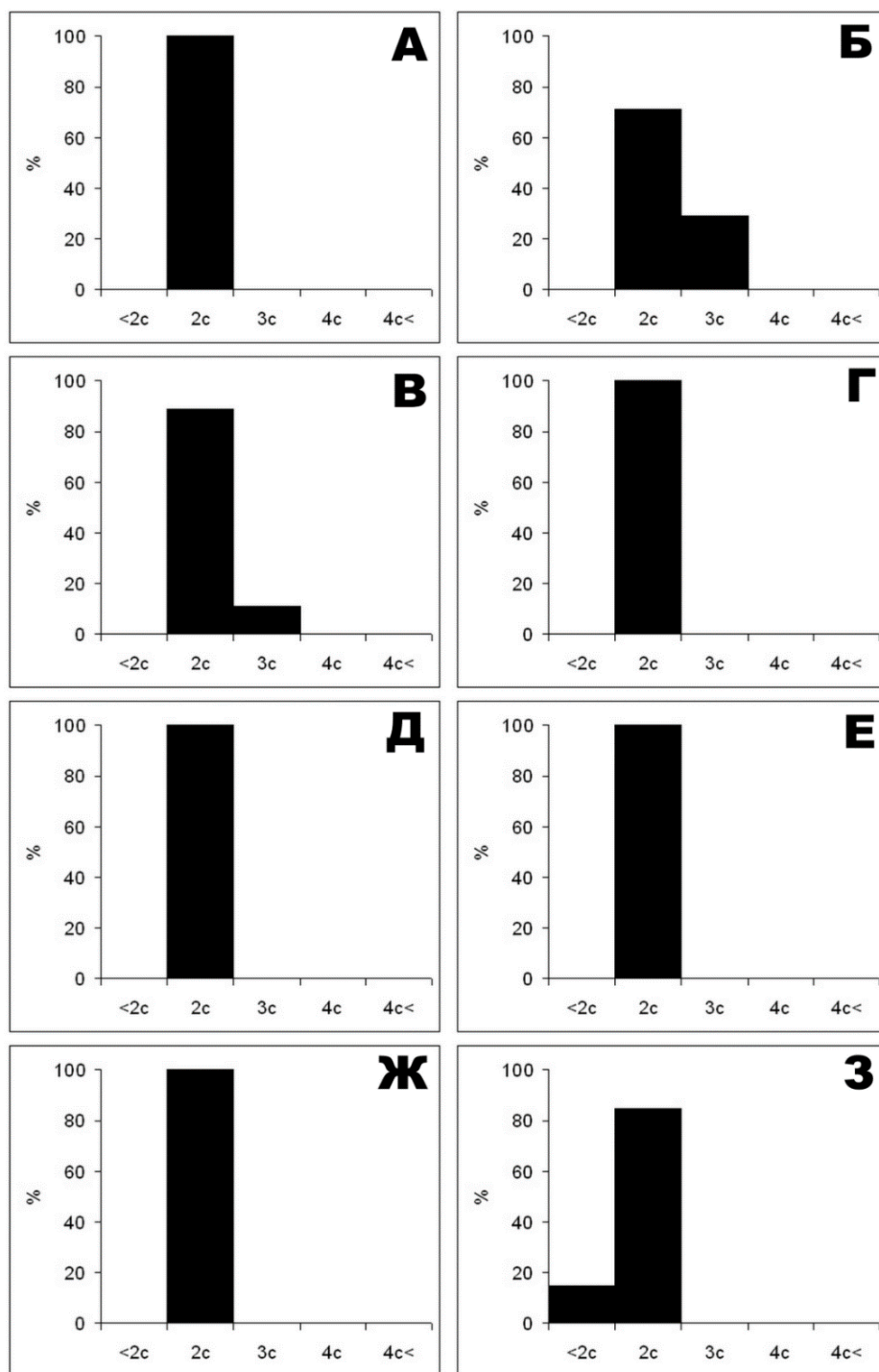


Рисунок 3. Распределение ядер нейтрофилов периферической крови свиней по классам плоидности в контроле и в динамике острой формы АЧС.

А-контроль, Б-1 день после заражения, В-2 день после заражения, Г-3 день после заражения, Д-4 день после заражения, Е-5 день после заражения, Ж-6 день после заражения, З-7 день после заражения.

### **3.2. ПАТОГЕНЕЗ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СВИНЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ ОСТРОЙ ФОРМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ**

#### **3.2.1. Популяционный анализ миелоидных клеток костного мозга свиней в норме и в динамике острой формы африканской чумы**

Исследования костного мозга свиней весьма редки (Jain 1986) и выявляют большой разброс данных по популяции костномозговых клеток (Harvey 2012).

Известно, что в костном мозге имеются две группы клеток. Это кроветворные и некроветворные клетки. К последним относятся фибробласты, остеобласты, жировые и эндотелиальные клетки, число которых не превышает 2% от всех клеток костного мозга свиней. На долю клеток паренхимы костного мозга приходится около 98% клеток, при этом в их число входят как морфологически нераспознаваемые родоначальные элементы, так и морфологически распознаваемые клетки, начиная с бластных и кончая зрелыми формами.

В данной работе рассматривается популяция клеток костного мозга без учета мегакариоцитов, макрофагов и недифференцируемых ранних стволовых клеток. Оказалось, что миелограмма костного мозга (таблица 5) представлена следующими клеточными линиями: это моноцитарная, лимфоидная, миелоидная, эритробластическая и эозинофильная линии.

По нашим и литературным данным (Любин & Конова 2005) около 32% приходится на клетки эритроидной линии, лимфоидная популяция, включая гранулярные лимфоциты, составляет около 37% популяции, миелоидная 24% и моноцитарная 7,4%. Как видно из таблицы 5, в контроле мертвые клетки не были обнаружены, но, начиная со 2 дни, они появляются в костном мозге свиней и к терминальной стадии составляют чуть меньше 25% популяции всех кроветворных клеток костного мозга, а число миелоидных клеток к этому времени уменьшается более чем вдвое и составляет около 10% популяции клеток костного мозга.

Серьезные изменения претерпевает также состав миелоидных клеток, представленный в таблице 6, в которой дается их распределение по степени зрелости в костном мозге свиней при острой форме африканской чумы. Как было сказано выше, по мере развития заболевания общее число миелоидных клеток значительно уменьшается.

Таблица 5.

Популяционный анализ основных ядерных форм клеток костного мозга свиней в норме и в динамике острой формы африканской чумы. (в %).

Типы клеток	Контроль	2 дни	3 дни	5 дни	7 дни
Моноциты-монобласты	7.4±0.8	9.2±1.7	9.4±1.2	9.3±0.5**	8.8±0.8
Лимфоидные клетки	27.1±1.2	29.6±1.7	21.1±1.0*	19.7±2.0*	19.1±1.2*
Миелоидные клетки	23.7±2.1	13.1±0.8*	15.9±2.2*	14.4±1.5*	10.3±1.0*
Гранулярные лимфоциты	9.9±1.2	10.9±0.9	10.9±1.0	8.3±0.6	8.7±0.7
Эритроидные клетки	31.9±1.5	25.1±1.1*	20.8±1.2*	24.3±1.6	22.0±1.2*
Разрушенные клетки	-	10.9±2.4**	19.1±2.6* *	22.8±4.0**	23.3±2.2**
Патологичные клетки	-	1.5±0.4**	3.8±0.6**	5.8±0.7**	6.8±1**

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

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

Так уже на вторые сутки их количество достоверно меньше по сравнению с контролем ( $p < 0.001$ ), а затем на протяжении всего заболевания эта тенденция сохраняется. Проведенный нами анализ распределения миелоидных клеток костного мозга свиней по степени зрелости в норме и при острой форме африканской чумы выявил незначительное увеличение числа ранних форм миелоидных клеток, которое сохраняется вплоть до терминальной стадии развития болезни и к 7 дни почти в два раза превышает их количество по сравнению с контролем. Важно отметить, что при этом основное место среди популяции миелоидных клеток занимают метамиелоциты.

Определение костномозгового индекса созревания миелоидных клеток показал, что у здоровых свиней он равен 0.59, когда из литературы известно, что в норме костномозговой индекс созревания нейтрофилов равен 0.6-0.8. т.е. он в наших исследованиях находится в пределах нормы. При этом уже на вторые сутки заболевания число ранних форм миелоидных клеток в 1.2 раза становится выше, чем в контроле, что свидетельствует о наличии резерва предшественников миелоидных клеток костного мозга.

Таблица 6.

Распределение миелоидных клеток костного мозга свиней по степени зрелости в норме и при острой форме африканской чумы (%).

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

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

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

В дальнейшем в течение первых трех суток он продолжает оставаться в допустимых пределах, соответственно 0.85, 0,74 и 0,79. Начиная с пятых суток костномозговой индекс резко повышается и к терминальной стадии достигает 2,7, т.е. происходит резкое

омоложение миелоидных клеток, а число патологических миелоидных клеток увеличивается до 10%.

В процессе заболевания количество палочкоядерных нейтрофилов постепенно увеличивается и к терминальной стадии почти в два раза превосходят их число в контроле. В то же время, количество сегментоядерных нейтрофилов на всем протяжении заболевания уменьшается и к терминальной стадии их количество более, чем в 8 раз становится меньше по сравнению с контролем, в результате чего – ранние формы миелоидных клеток на терминальных стадиях достигают 65% популяции.

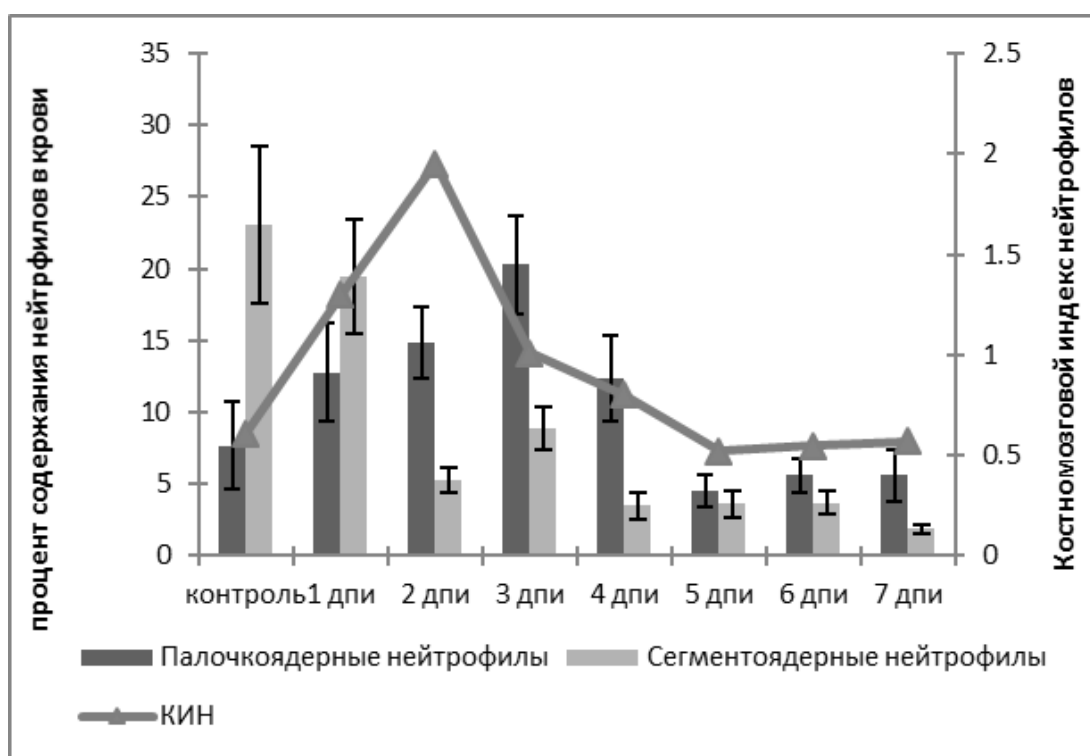


Рисунок 4. Динамика изменений соотношения числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов периферической крови и костного мозга при АЧС.

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

болезни происходит недостоверное увеличение числа ранних форм миелоидных клеток на фоне незначительного лимфоцитоза, т.е. происходит омоложение миелоидных клеток, что свидетельствует о регенеративном сдвиге нейтрофилов и говорит о повышенной деятельности костного мозга, который является органом кроветворения.

С 3 дни и до конца болезни он заменяется дегенеративным сдвигом миелоидной популяции, когда происходит значительное увеличение числа палочкоядерных и дегенеративных нейтрофилов, что свидетельствует об угнетении функции костного мозга, а на терминальной стадии заболевания дегенеративный сдвиг нейтрофилов усугубляется и число сегментоядерных нейтрофилов уменьшается более чем в 8 раз, а число патологических миелоидных клеток увеличивается до 10%. Такой сдвиг нейтрофилов на фоне лейкопении скорее всего свидетельствует о развитии вирусной инфекции.

### **3.2.2. Динамика изменений площади и содержания РНК в миелоидных клетках костного мозга в процессе острой формы африканской чумы свиней.**

Известно, что на долю клеток паренхимы костного мозга приходится около 98% клеток, при этом в их число входят как морфологически нераспознаваемые родоначальные элементы, так и морфологически распознаваемые клетки, начиная с бластных и кончая зрелыми формами. В данной работе рассматривается популяция миелоидных клеток костного мозга без учета мегакариоцитов, макрофагов и недифференцируемых ранних стволовых клеток, которые по нашим и литературным данным составляют около 24% клеток паренхимы костного мозга (Сароян et al. 2015).

Ранее нами было показано, что при острой форме АЧС состав миелоидных клеток КМ претерпевает серьезные изменения (Сароян et al. 2015). По мере развития заболевания общее число миелоидных клеток КМ значительно уменьшается и изменяется их распределение по степени зрелости. Важно отметить, что основное место среди миелоидных клеток КМ занимают метамиелоциты, количество которых на всем протяжении увеличиваясь, на терминальных стадиях превосходит их число в контроле почти в два раза.



Как видно из таблицы 7 самыми крупными клетками в популяции миелоидных клеток, как у здоровых особей, так и при заболевании, являются миелобласты, площадь которых недостоверно крупнее всех исследованных миелоидных клеток. Последние остаются самыми крупными миелоидными клетками на всем протяжении болезни. Это относится и к размерам ядра, цитоплазмы и ядрышек. В дальнейшем, на всем протяжении болезни вплоть до терминальной стадии заболевания – размеры миелобластов достоверно увеличиваются ( $p < 0.001$ ). В контроле по мере дифференцировки миелоидные клетки недостоверно уменьшаются в размерах. Во время болезни все миелоидные клетки (таблица 7), оказались недостоверно крупнее, чем соответствующие им клетки в контроле. Размеры цитоплазмы, ядра, и ядрышек последних во время болезни значительно, но недостоверно увеличиваются.

Промиелоциты и метамиелоциты с первых суток болезни достоверно увеличиваются в размерах. Как было показано ранее (Сароян et al. 2015) на метамиелоциты в терминальной стадии приходится около половины всей популяции миелоидных клеток крови, а размеры их ядер и цитоплазмы достоверно увеличиваются, в то время как площадь ядрышек сохраняет лишь тенденцию к увеличению, и к завершающей стадии всего на 40% больше, чем в контроле.

Площадь палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов на всем протяжении болезни увеличивается недостоверно и к 7 дни площадь палочкоядерных нейтрофилов на 35% превосходит, а сегментоядерных нейтрофилов примерно на 20% превышает их размеры по сравнению с контролем, хотя различия опять-таки недостоверны. Возможно это связано с увеличением на последних стадиях болезни числа гигантских палочкоядерных нейтрофилов, что вероятно отражается на средней площади последних. Гигантские нейтрофилы встречаются со 2 дни и вплоть до терминальной стадии болезни, но их число не превышает 2% популяции миелоидных клеток, а количество гиперсегментированных нейтрофилов несколько выше, но не достигает 3%. Такая же тенденция имеет место и в размерах ядра и цитоплазмы нейтрофилов.

Как видно из таблицы 8, содержание РНК во всех исследованных миелоидных клетках КМ на протяжении всей болезни вплоть до терминальной стадии по сравнению с

контролем претерпевают серьезные изменения: так площадь всех клеток, их цитоплазмы, и ядра по мере развития болезни значительно, но недостоверно увеличивается ( $p < 0.005$ ). При этом размеры ядрышек миелоцитов увеличиваются достоверно, что возможно связано с активацией их пролиферативной активности вследствие гибели большого количества нейтрофилов из-за болезни.

Аналогичная картина наблюдается и с промиелоцитами, за исключением того, что размеры ядрышек сохраняют тенденцию к увеличению, однако различия между их площадью на терминальной стадии по сравнению с контролем в отличие от миелобластов недостоверны. Содержание РНК в промиелоцитах, которые появляются в КМ в небольшом количестве уже на первые сутки заболевания, достоверно превышает содержание РНК во всех промиелоцитах на протяжении всей болезни, за исключением того, что содержание РНК в ядрышках метамиелоцитов вначале значительно увеличивается, а затем доходит до контрольного уровня. Содержание РНК в метамиелоцитах, число которых значительно увеличивается в течение болезни и к терминальной стадии составляет около 50% популяции миелоидных клеток КМ также достоверно возрастает.

В нейтрофилах КМ содержание РНК незначительно меньше, чем в более ранних формах миелоидных клеток. В процессе развития болезни содержание РНК в них также достоверно увеличивается.

Таким образом, можно сделать предположение, что болезнь вызывает не только резкое омоложение клеток миелоидного ряда КМ, вплоть до появления самых молодых из распознаваемых визуально миелобластов, но и увеличение площади и содержания РНК во всех клеточных элементах миелоидного ряда. При этом наиболее резкое увеличение происходит в первые сутки заболевания, а затем плавно, но менее выражено, продолжает увеличиваться по сравнению с контролем. При сравнении изменений площадей исследуемых клеток и содержания в их структурах РНК оказалось, что они прямо пропорциональны.

Таблица 7.

Динамика изменений площади миелоидных клеток костного мозга свиней при острой форме африканской чумы (мкм<sup>2</sup>).

Типы клеток	Структура	Контроль	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Миелобласты	Клетка	170.6±18.9	271.2±28.5	260.6±23.8	224.3±7.9	-	239.9±17.2	-
	Ядро	95.9±9.2	130.2±18.4	116.6±9.3	107.6±5.8	-	130.0±21.6	-
	Цитоплазма	74.7±12.1	140.9±14.4**	144.1±19.1**	116.7±3.5**	-	109.9±5.9**	-
	Ядрышко	7.1±0.5	8.6±1.2	8.0±0.9	7.8±0.5	-	9.3±1.0	-
Промиелоциты	Клетка	141.8±13.2	218.4±25.5	177.9±7.7	175.7±19.6	206.9±19.7	199.8±17.3	192.0±31.6
	Ядро	78.0±7.2	102.6±10.4	83.1±4.2	100.5±12.1	105.1±14.2	127.8±10.7	104.6±23.3
	Цитоплазма	63.8±6.8	115.8±9.4**	94.8±4.1**	75.3±8.4	102.1±7.2**	72.2±8.3	87.5±28.4**
	Ядрышко	6.2±0.7	8.5±1.4	6.9±0.4	6.1±1.1	6.4±1.4	8.3±1.1	7.1±1.3
Метамиелоциты	Клетка	117.8±4.9	166.1±14.5**	162.7±12.7**	163.1±5.9	154.4±6.6**	168.8±9.3**	171.4±4.2**
	Ядро	62.1±2.5	75.5±5.3	75.5±7.0	80.5±4.5	77.5±0.2	90.1±5.7	85.9±2.7
	Цитоплазма	55.7±4.4	90.6±9.9**	87.2±6.8**	82.6±4.0**	76.9±6.3**	78.7±5.3**	85.5±5.1**
	Ядрышко	5.5±0.7	7.4±0.6	6.6±0.6	5.2±0.5	4.9±0.2	7.3±0.5	9.5±1.6
Палочкоядерные нейтрофилы	Клетка	121.2±4.7	159.0±16.1	176.2±7.7	154.2±6.0	144.5±12.9	166.8±6.6	164.3±8.1
	Ядро	63.1±2.8	55.9±4.9	80.2±3.8	76.3±2.9	69.8±4.5	84.7±6.4	87.7±5.6
	Цитоплазма	58.1±2.8	103.0±9.0**	96.0±5.3**	77.9±4.3**	74.7±9.5**	82.2±5.8**	76.6±11.6**
Сегментоядерные нейтрофилы	Клетка	131.6±5.8	170.2±11.1	172.5±6.5	170.9±21.1	167.2±12.7	167.8±9.0	156.6±11.9
	Ядро	66.2±2.4	83.7±9.8*	79.6±3.2	83.2±8.3	82.7±4.2	89.9±4.8	86.0±18.1
	Цитоплазма	64.8±3.8	86.5±7.1*	92.9±3.3**	87.8±9.3**	84.9±9.3*	77.9±8.2*	70.6±22.4

\*тенденция (p&lt;0.1)

\*\*достоверно выше по сравнению с контролем (p&lt;0.05-0.01)

Таблица 8.

Динамика изменений содержания РНК в миелоидных клетках костного мозга при острой форме африканской чумы свиней (мкм<sup>2</sup>).

Типы клеток	Структура	Контроль	2 дни	3 дни	4 дни	5 дни	6 дни	7 дни
Миелобласты	Клетка	190±27.2	323.8±34	305.5±37.8	193.7±8.3	-	306.1±24.1	-
	Ядро	91.3±11.9	134±22.3	114.4±9.7	107.6±5	-	224.4±30.3	-
	Цитоплазма	98.7±17.8	189.8±19.1**	191.2±31.1*	86.1±4.3*	-	81.7±8.7	-
	Ядрышко	5.5±0.5	7.7±1.3	7.2±0.8	7.2±0.8	-	10.7±1.2	-
Промиелоциты	Клетка	167.2±16.2	250.4±49.3	207.1±8.4	203.5±19.9	259±22	244.6±17.3	214.4±61.2
	Ядро	80.1±7.5	107.3±18.8	79.1±4.3	108.2±11.2	116.8±17.1	147.8±9.8	100.2±22.4
	Цитоплазма	87.1±9.2	143.1±33.1**	128.0±4.7**	95.3±9.4	142.2±8.7**	96.8±10.3	114.2±38.8*
	Ядрышко	5.7±0.6	8.3±1.4	5.4±0.3	6.3±1.2	6.7±1.6	6.1±1.3	5.7±0.6
Метамиелоциты	Клетка	144.1±6.4	242.7±19.7	191.8±15.3	200.6±7.6	183.8±7.2	209.1±12.7	198.3±6.7
	Ядро	66.6±3.5	72.5±6.5	74.2±7.6	90.4±6.4	93.1±1.3	98.7±7.1	84.6±4.5
	Цитоплазма	77.5±6.0	170.2±15.0**	117.7±9.1**	110.2±5.3**	90.7±8.4	110.4±7.6**	113.7±7.1**
	Ядрышко	5.2±0.7	6.9±0.6	5.6±0.5	5.1±0.4	4.8±0.3	7.9±0.6	8.5±1.6
Палочкоядерные нейтрофилы	Клетка	144.5±6.2	216.5±19.4	209.7±9.7	185±8.2	170.7±16.2	201.1±9.2	187.6±10.2
	Ядро	65.8±3.5	58.2±5.5	80.3±4.4	83.7±3.7	71.0±4.7	98.0±7.9	85.5±6.7
	Цитоплазма	78.6±3.8	158.3±18.1**	129.4±7.3**	101.4±5.7**	99.7±12.5*	103.1±8**	102.1±14.6**
Сегментоядерные нейтрофилы	Клетка	134.6±7.9	184.7±21.3	208.9±5.4	212.3±28.6	203.7±18.3	217.9±10.5	178.7±17.2
	Ядро	58.1±3.1	65.6±7.6	67.4±0.2	93.1±11.2	80.3±6.8	96.2±6.4	87.9±20.2
	Цитоплазма	76.5±5.4	119.2±11.4**	141.5±5.6**	119.2±18.0**	123.4±14.1**	121.7±10.3*	90.8±29.1

\*тенденция (p<0.1)

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

### 3.2.3. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток костного мозга при острой форме АЧС

Наши данные свидетельствуют, что у здоровых свиней ранние формы миелоидных клеток КМ составляют около трети всех клеток данной популяции и по содержанию ДНК представлены диплоидными (60%) и синтезирующими ДНК (40%) клетками (рисунок 5А).

В течение заболевания вплоть до терминальной стадии такое распределение ранних миелоидных клеток сохраняется (рис. 5Б, 5В, 5Г). Меняется лишь соотношение диплоидных и триплоидных клеток, но при этом сохраняется преобладание диплоидных клеток. На терминальной стадии появляются гиподиплоидные клетки, что, вероятнее всего, является свидетельством гибели части миелоидных клеток на завершающей стадии заболевания (рис. 5Д).

На рисунке 6 приведена динамика изменений в распределении ядер нейтрофилов по классам пloidности. На гистограмме палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы представлены суммарно в виду того, что их ядра мало отличаются друг от друга по содержанию ДНК и в контроле все нейтрофилы диплоидны (рис. 6А), однако с первых дней болезни и вплоть до терминальной стадии заболевания в популяции появляются в небольшом количестве гипердиплоидные ядра (рисунок 6Б, 6В, 6Г), а на завершающей стадии болезни, появляются в небольшом количестве гиподиплоидные нейтрофилы, что свидетельствует о гибели части нейтрофилов на завершающих стадиях болезни.

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

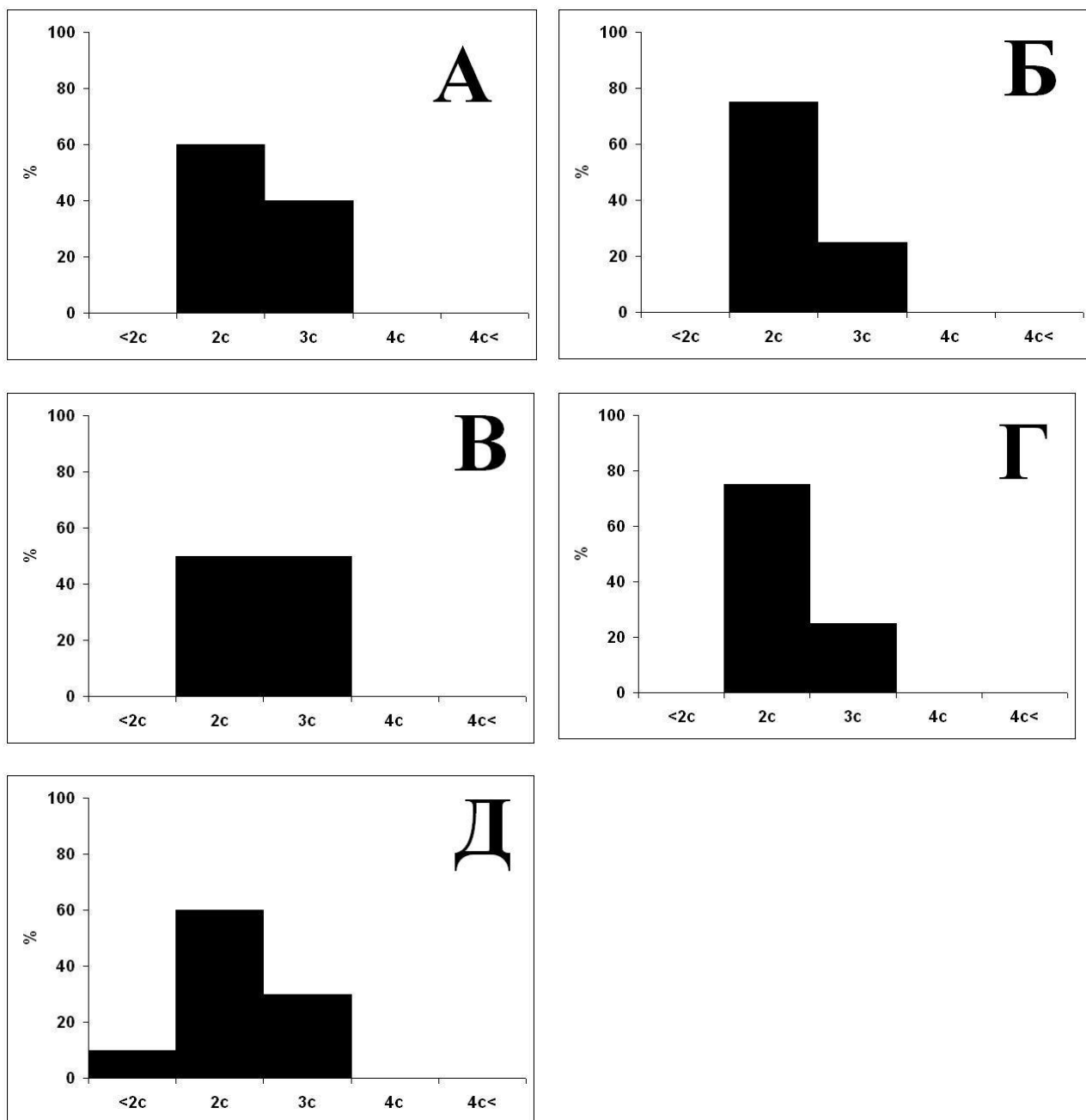


Рисунок 5. Распределение ядер ранних миелоидных клеток (суммарно) костного мозга свиней по классам плоидности в динамике острой формы АЧС.

*По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”*

*По оси ординат – частота встречаемости*

*А. – контроль, Б. – 2 дни, В – 3 дни, Г – 4 дни, Д – 5 дни, Е – 6 дни, Ж – 7 дни.*

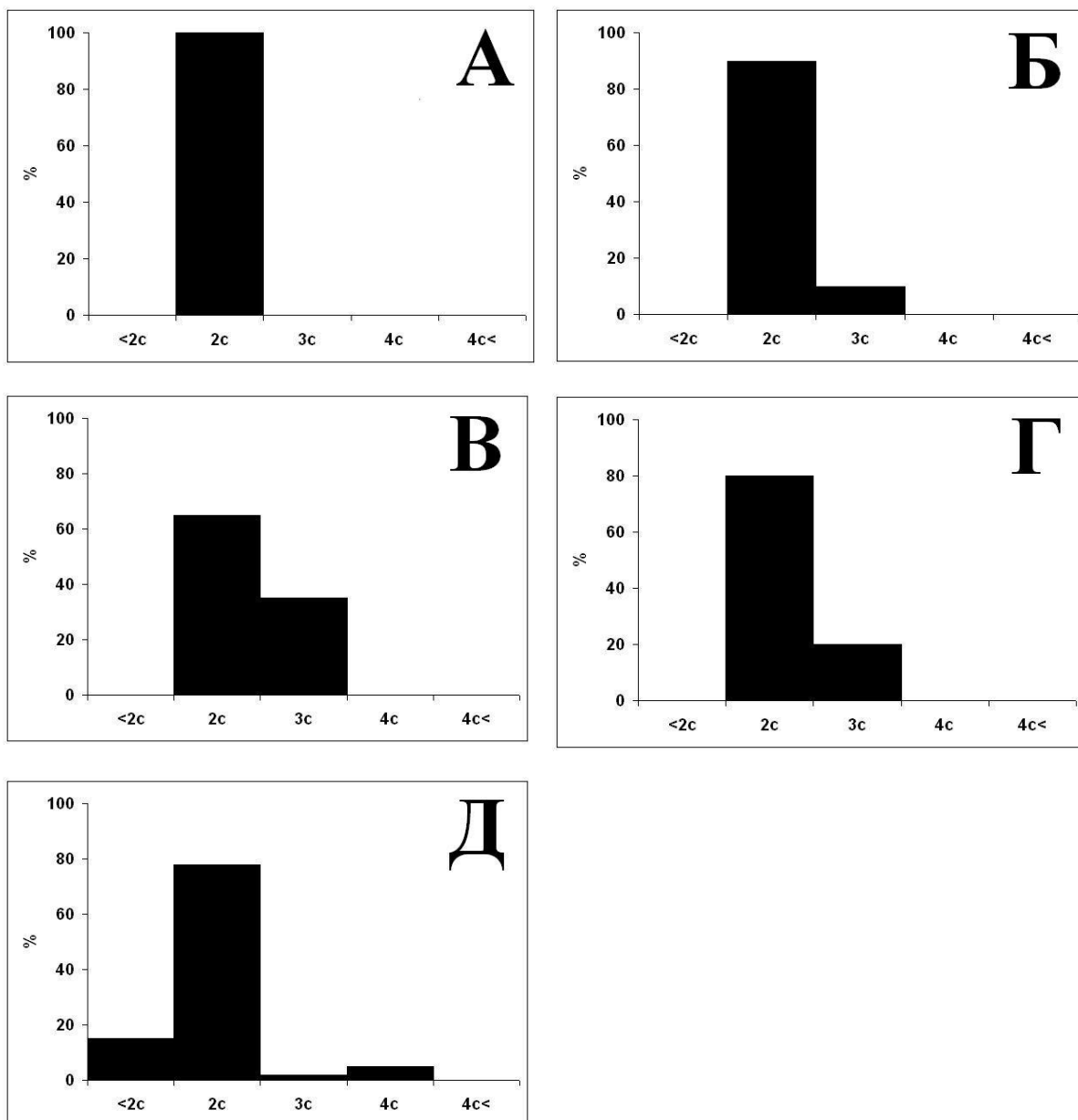


Рисунок 6. Распределение ядер нейтрофилов (суммарно) костного мозга свиней по классам плоидности в контроле и в динамике острой формы АЧС.

*По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”*

*По оси ординат – частота встречаемости*

*А. – контроль, Б. – 2 дни, В – 3 дни, Г – 4 дни, Д – 5 дни, Е – 6 дни, Ж – 7 дни.*

### **3.3. ПАТОГЕНЕЗ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ СВИНЕЙ В НОРМЕ И ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ВИРУСОМ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ**

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

Изучение первичной культуры костного мозга свиней представляет собой удобную модель для исследования некоторых сторон патогенеза АЧС, и, в частности, дифференцировку и транскрипционную активность различных гемо- и иммунопоэтических клеток.

В данной работе нами исследовались популяционные показатели миелоидных клеток первичной культуры костного мозга свиней (ПККМ), их выживаемость и транскрипционная активность, т.к. они являются источником дополнительной репликации вируса (Ballester et al. 2010) и играют решающую роль в иммунной защите против бактериальных и грибковые патогенов, а также участвуют в развитии воспалительной реакции (Nathan 2006).

Новые исследования выявили также доказательства важной роли нейтрофилов в противовирусной защите хозяина (Vorregaard et al. 2007; Jenne et al. 2013). Отсюда основной целью работы явилось изучение особенностей выживания и динамики транскрипционной активности миелоидных клеток свиней в процессе культивирования и при действии на них вируса АЧС.

Известно, что пул выделяемых из костного мозга (КМ) свиней гемо- и иммунопоэтических клеток весьма гетерогенен. Помимо гемопоэтических клеток, он включает в себя клеточные элементы лимфо-, миело- и эритропоэза. Это предшественники лимфоцитов, гранулоцитов и системы мононуклеарных фагоцитов (Макаров et al. 1992). Ранее нами было проведено исследование изменений в популяционном составе основных идентифицируемых клеток ПККМ свиней, представленных на таблице 9 (Каралова et al. 2011; Karalova et al. 2011), из которой видно, что через 24 часа от начала культивирования в ПККМ интактной взрослой свиньи живыми оказалось около половины всех гемо- и иммунопоэтических клеток, из которых преобладающими явились (33%) клеточные



элементы белой крови, а на долю эритроидных клеток пришлось около 18% популяции живых клеток культуры.

Основную массу клеток белой крови составляла лимфоидная популяция (почти 20%), в то время как на миелоидные клетки пришлось всего около 3% живых клеток культуры крови. В процессе культивирования процент живых клеток уменьшился более чем в 3.5 раза и к 96 часам их оказалось менее 15%, среди которых около 2% составляли миелоидные клетки. Фактически наблюдалась более или менее равномерная гибель клеток как белого, так и красного ростка. (таблица 9). Ранее нами также было показано, что в процессе культивирования наиболее стабильными оказались сравнительно более зрелые клетки (лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, полихроматофильные и оксифильные эритроциты). Процент ранних незрелых клеток (монобласты, лимфобласты, проэритробласты) снижался намного интенсивнее.

Причиной большей лабильности ранних форм клеток ПККМ возможно можно объяснить как их меньшей устойчивостью, так и созреванием-дифференцировкой (Karalova et al. 2011; Каралова et al. 2011).

Исследование распределения миелоидных клеток первичной культуры костного мозга свиней по степени зрелости выявило, что в контроле около 40% всех миелоидных клеток культуры составляют метамиелоциты (таблица 10). Как видно из таблицы, наиболее ранние формы миелоидных клеток, начиная со вторых суток культивирования, значительно и достоверно уменьшается, включая и метамиелоциты, но при этом более чем в 4 раза увеличивается количество нейтрофилов. Уже к 3-им суткам наиболее ранние миелоидные клетки – миелобласты, полностью исчезают, а промиелоциты и метамиелоциты уменьшаются в 3 и 2,5 раза соответственно. При внесении в среду ПККМ вируса АЧС в различных клетках белой крови он реплицируется с возрастанием титра до  $10^6$  ГАЕ<sub>50</sub>/мл. Репликация вируса уже через сутки после его введения в среду сопровождается достоверным уменьшением по сравнению с контролем количества всех основных форм клеток крови, за исключением миелоидных клеток ( $p < 0.05$ ), включая и число разрушенных клеток.

Важно отметить, что число разрушенных клеток к 96 часам культивирования с вирусом АЧС не более чем на 2% превышало их количество в контроле (таблица 9). Уже через 24 часа

культивирования с вирусом АЧС общее количество миелоидных клеток увеличивается более, чем в 1.5 раза. Однако резко уменьшается количество наиболее ранних миелоидных клеток, затем промиелоцитов и метамиелоцитов, а число нейтрофилов увеличивается в среднем в 1.7 раз.

При этом количество сегментоядерных нейтрофилов более чем в два раза превышает их число в контроле. По мере культивирования клеток с вирусом уже на первые и вторые сутки количество миелобластов уменьшается втрое по сравнению с контролем, а затем последние полностью исчезают. Количество промиелоцитов на вторые сутки культивирования уменьшается вдвое, а в дальнейшем сохраняется на том же уровне, лишь незначительно уменьшаясь. Число метамиелоцитов на протяжении культивирования плавно, но недостоверно уменьшается и в 2.5 раза оказывается меньше, чем в контроле на первые сутки и в 1.2 раза меньше, чем в контроле к концу культивирования.

Исследование динамики изменений размеров основных клеток первичной культуры КМ в течение четырех суток культивирования (таблица 9) показало, что в отличие от лимфобластов и проэритробластов, которые являлись наиболее крупными клетками культуры КМ, среди миелоидных клеток наиболее крупными, превышающими размеры ранних миелоидных клеток в среднем на 30%, являются сегментоядерные нейтрофилы.

Важно заметить, что в течение всего срока культивирования размеры всех видов ранних миелоидных клеток в контроле, в том числе площадь их ядер и ядрышек достоверно уменьшаются, за исключением метамиелоцитов, площадь клеточных структур которых также уменьшается, но недостоверно. В то же время размеры палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов на протяжении всего срока культивирования в контрольной группе достоверно уменьшается.

При введении вируса в среду на первые сутки культивирования площадь ранних миелоидных клеток не меняется, а площадь нейтрофилов вплоть до третьих суток включительно не меняется, однако по сравнению с соответствующим контролем уже на вторые сутки размеры палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с соответствующим контролем достоверно увеличивается, и эта тенденция сохраняется до конца культивирования.

Таблица 9.

Популяционный анализ основных клеток культуры костного мозга свиней в норме и при острой форме африканской чумы (%).

Клетки	Сроки культивации							
	24 ч		48 ч		72 ч		96 ч	
	контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС
Моноциты	3.9±0.5	4.1±0.5	2.7±0.2	2.9±0.2	1.2±0.1	2.1±0.4	0.9±0.2	1.4±0.3
Лимфоциты	19.4±0.8	10.6±0.2**	10.1±0.5	6.8±0.6**	7.4±0.4	6.3±0.3***	6.0±0.4	4.9±0.7 <sup>a</sup>
Миелоидные клетки	2.7±0.5	4.2±1.5*	5.2±0.5	6.3±0.9*	4.8±0.4	3.9±0.3	2.3±0.3	1.8±0.2
Эозинофилы	7.1±2.4	4.4±0.4	5.2±0.3	2.8±0.4	2.3±0.1	2.5±0.2	1.9±0.2	1.3±0.2
Эритроидные клетки	18.0±0.5	20.6±0.3	12.6±0.4	10.8±0.4	7.2±0.3	6.2±0.1	4.8±0.1	4.3±0.1
Разрушенные клетки	48.9±1.1	56.1±0.7*	64.2±2.6	70.4±1.1*	77.1±6.2	78.9±3.2	84.1±6.4	86.3±0.8

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

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

<sup>a</sup> тенденция (p<0.1)

Таблица 10.

Распределение миелоидных клеток культуры костного мозга свиней по степени зрелости в норме и при острой форме африканской чумы (%).

Клетки	Сроки культивации							
	24 ч		48 ч		72 ч		96 ч	
	контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС
Миелоидные клетки	2.7±0.5	4.2±1.5	5.2±0.5	6.3±0.9	4.8±0.4	3.9±0.3*	2.3±0.3	1.8±0.2 <sup>a</sup>
Миелобласты	10.7±1.2	3.5±0.3*	3.9±0.2	3.7±0.7	3.7±0.1	-*	-	-
Промиелоциты	17.9±1.5	14.0±1.0	10.7±0.9	6.6±1.8*	6.4±0.9	5.4±0.3	5.4±1.1	5.7±1.4
Метамиелоциты	39.3±8.8	27.6±4.2 <sup>a</sup>	26.6±7.0	21.2±4.3	22.2±4.8	17.3±4.9	19.4±3.7	15.8±1.9
Палочкоядерные	19.6±5.2	25.9±3.7 <sup>a</sup>	18.3±2.7	26.8±5.7 <sup>a</sup>	24.6±2.7	32.2±3.6**	29.4±3.1	24.5±5.1
Сегментоядерные	12.5±2.0	29.0±3.4**	40.5±8.1	41.7±8.7	43.1±7.2	45.1±7.4	45.8±6.1	54.0±7.3 <sup>a</sup>

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

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

<sup>a</sup> тенденция (p<0.1)

Таблица 11.

Динамика изменений размеров миелоидных клеток ПККМ свиней в течение четырех суток культивирования с и без вируса АЧ (мкм<sup>2</sup>).

Клетки	Структура	24ч		48 ч		72 ч		96 ч	
		контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС
Миелобласты	Клетка	105.7±8.5	82.9±8.4	82±9.9	-	105.8±49.8	113.2±7.7**	-	-
	Ядро	64.5±4.6	51±5.8	47.3±2	-	50.3±17.2	68.9±2.9 <sup>a</sup>	-	-
	Цитоплазма	41.2±4.9	31.9±4.5	34.6±8.1	-	55.5±32.5	44.3±6.4 <sup>a</sup>	-	-
	Ядрышко	5.2±0.4	3.3±0.8	3.6±0.7	-	3.2±0.3	3.4±0.2	-	-
Промиелоциты	Клетка	121.4±5.6	99±21.9	105.7±12.3	105.8±11	116.5±12	114.2±21.4	129.9±18.6	60.5±4.6*
	Ядро	61.6±3.3	50.1±11.8	57.2±6.8	54.2±4.4	53.6±5.4	57.2±8.2	66.4±3.5	36.1±3.7*
	Цитоплазма	59.7±5.2	48.8±10.2	48.4±7.4	51.7±7.9	62.9±7.7	57±14.3	63.5±15.8	24.4±1.9*
	Ядрышко	4.3±0.4	3.9±0.6	3.3±0.5	3.1±0.3	3.1±0.3	3.2±0.2	3.8±0.8	2.7±0.6
Метамиелоциты	Клетка	125.5±4.5	92.4±7.8	82.9±2.7	83.6±11.2	118.3±9.7	140.4±9.8**	130.3±4.9**	60.8±3.7*
	Ядро	59.9±2.1	46.7±5.6	42.3±2.4	49.4±8.3	52.5±4.7	64.7±4.8**	60.7±2.2**	29.1±1.7*
	Цитоплазма	65.6±3.8	45.7±5.1	40.5±1.8	34.2±3.2	65.8±5.8	75.7±7.9**	69.6±4.7**	31.6±2.7*
	Ядрышко	3.9±0.2	3.2±0.4	2.9±0.2	2.4±0.6	2.8±0.2	3.4±0.2	3.8±0.4	2.2±0.3
Палочкоядерные нейтрофилы	Клетка	132.5±5.8	85.6±12.9	95.0±6.0	75.3±10.2	138.0±11.4	139.5±5.0	137.8±5.7	97.9±3.3
	Ядро	59.3±2.6	40.6±3.6	42.3±2.4	33.7±5	59.9±5.1	58.9±2.0	59.6±1.6	35.6±3.5
	Цитоплазма	73.2±5	45±11.4	52.7±4.3	41.6±6.1	78.1±7.7	80.7±4.7	78.2±5.9	62.2±2.1
Сегментоядерные нейтрофилы	Клетка	139.9±5.0	83.3±4.5	85.3±5.0	71.3±8.9	152.0±8.5	151±8.2**	159.8±8.1**	99.2±5.9 <sup>a</sup>
	Ядро	53.3±2.3	39.2±1.3	40.1±1.5	41.9±10.2	61.8±2.2	61.9±2.2**	64.3±1.3**	38.1±2.9
	Цитоплазма	86.6±2.9	44.1±3.6	45.2±3.9	29.5±1.2	100.2±8.1	89.1±8.6**	95.4±8**	61.1±3.7**

\* достоверно ниже по сравнению с контролем (p&lt;0.05-0.01)

\*\* достоверно выше по сравнению с контролем (p&lt;0.05-0.01)

<sup>a</sup> тенденция (p<0.1)

Таблица 12.

Динамика изменений содержания РНК в миелоидных клетках ПККМ в течение четырех суток культивирования с и без вируса АЧ.

Клетки	Структура	24ч		48 ч		72 ч		96 ч	
		контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС	контроль	АЧС
Миелобласты	Клетка	105.9±10.2	81.1±9.7	77.9±13.5	-	107.8±24.4	105.8±9.7 <sup>a</sup>	-	-
	Ядро	53.6±5.2	39.7±6.2	33.7±2.5	-	38.2±18.0	41.8±5.1	-	-
	Цитоплазма	52.3±6.2	41.4±6.0	44.1±11.3	-	69.6±26.4	64.0±7.4**	-	-
	Ядрышко	3.6±0.4	1.7±0.5	1.7±0.3	-	1.9±0.5	2.2±0.2	-	-
Промиелоциты	Клетка	127.1±8.9	101.8±24.6	109.1±15.1	106±12.9	119.8±14.2	115.8±26.4	124.2±24.9	51.1±1.7*
	Ядро	50.1±3.3	37.5±11.3	45.6±7.5	39.8±3.7	38.7±4.9	41.4±8.0	42.7±4.7	22.4±2.4*
	Цитоплазма	77±7.8	64.3±13.3	63.6±10	66.2±10.3	81.0±10.6	74.4±19.5	81.5±21.6	28.7±1.1*
	Ядрышко	2.8±0.3	2.1±0.6	2.0±0.4	1.7±0.3	1.6±0.2	1.7±0.2	2.5±0.5	1.0±0.2
Метамиелоциты	Клетка	136.3±6.2	95.8±8.6	82.7±3.2	76.6±10.2	123.8±12.0	147.5±11.6	133.3±6.6	54.2±4.2*
	Ядро	50.6±2.5	35.7±5.5	29.7±2.5	34.3±7.1	38.5±4.7	49.7±4.8	44.7±2.7	16.3±1.2*
	Цитоплазма	85.7±5.3	60.2±6.8	53.0±2.2	42.2±3.6	85.3±8.1	97.8±10.3	88.6±6.2	37.8±3.4*
	Ядрышко	2.8±0.2	1.7±0.3	1.5±0.2	1.2±0.3	1.6±0.2	2.0±0.2	2.2±0.2	0.8±0.1
Палочкоядерные нейтрофилы	Клетка	144.7±7.3	86.3±15.7	99.3±8.1	72.7±8.3	147.8±14.1	143.9±7.2**	144.3±7.3**	108.3±3.2 <sup>a</sup>
	Ядро	48.5±2.9	28.8±3.8	30.6±2.7	21.7±2.0	47±5.2	43.3±2.3**	44.6±2.2**	43.3±2.0**
	Цитоплазма	96.2±6.5	57.5±14.9	68.7±6.1	50.9±7.3	87.8±10.2	100.6±6.4**	99.7±7.8**	55.0±2.9
Сегментоядерные нейтрофилы	Клетка	161.6±7.5	85.1±5.8	89.1±6.9	99.5±3.1	133.5±11.8 <sup>a</sup>	132.2±10.5**	125.8±11.7**	99.2±7.9
	Ядро	44.3±3.3	28.1±1.4	29.0±1.8	41.6±5	50.2±2.7 <sup>a</sup>	46.7±2.7**	50.8±1.4**	44.1±4.1
	Цитоплазма	117.3±4.4	57.0±4.8	60.0±5.6	57.9±1.9	98±11.2	101.2±5.6**	112.5±6.2**	83.0±4.2

\* достоверно ниже по сравнению с контролем (p&lt;0.05-0.01)

\*\* достоверно выше по сравнению с контролем (p&lt;0.05-0.01)

<sup>a</sup> тенденция (p<0.1)

Соответственно изменениям площади клеток меняется и площадь ядер. В течение 96 часов культивирования площадь всех исследованных клеток постепенно, но незначительно увеличивалась, а к 96 часам резко уменьшилась в среднем на 20-50%. Из таблицы 11 видно, что содержание РНК как в цитоплазме, так и в ядре всех исследованных клеток меняется аналогично изменениям размеров клеток.

Как и следовало ожидать, наибольшее количество РНК было выявлено в ядрах ранних клетках миелоидного ряда ПККМ, т.е. в тех клетках, которые способны к делению. Соответственно в ядрах этих клеток содержится больше РНК, чем в более дифференцированных клетках. В течение первых трех суток культивирования количество РНК в ядре и цитоплазме всех исследованных клеток увеличивается, а на четвертые сутки оно резко падает: в ядрах в среднем на 50% - 70%, а в цитоплазме от 20% до 60%.

Таким образом, проведенное нами исследование выявило резкое снижение жизнеспособности клеток ПККМ к 4-м суткам культивирования. При этом наиболее лабильными оказались ранние формы клеток КМ. Основу ПККМ на 4-е сутки культивирования составляют лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы и поздние формы эритробластов. Важно отметить, что к концу культивирования наблюдается снижение размеров практически всех исследованных типов клеток и соответственно уменьшение содержания РНК в них.

Последнее говорит об угнетении метаболических процессов в клетках ПККМ к 96 часам инкубации.

### 3.3.2. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток первичной культуры костного мозга свиней без и с воздействием вируса АЧ.

Ниже приведены данные по исследованию динамики изменений содержания ДНК в ядрах миелоидных клеток первичной культуры костного мозга свиней без и с воздействием вируса АЧ. Выявленные нами данные о тенденции к более выраженному увеличению размеров цитоплазмы по сравнению с ядром миелоидных клеток и нейтрофилов хорошо согласуются с литературными данными, свидетельствующими об увеличении размеров цитоплазмы по сравнению с ядром при активации лимфоцитов.

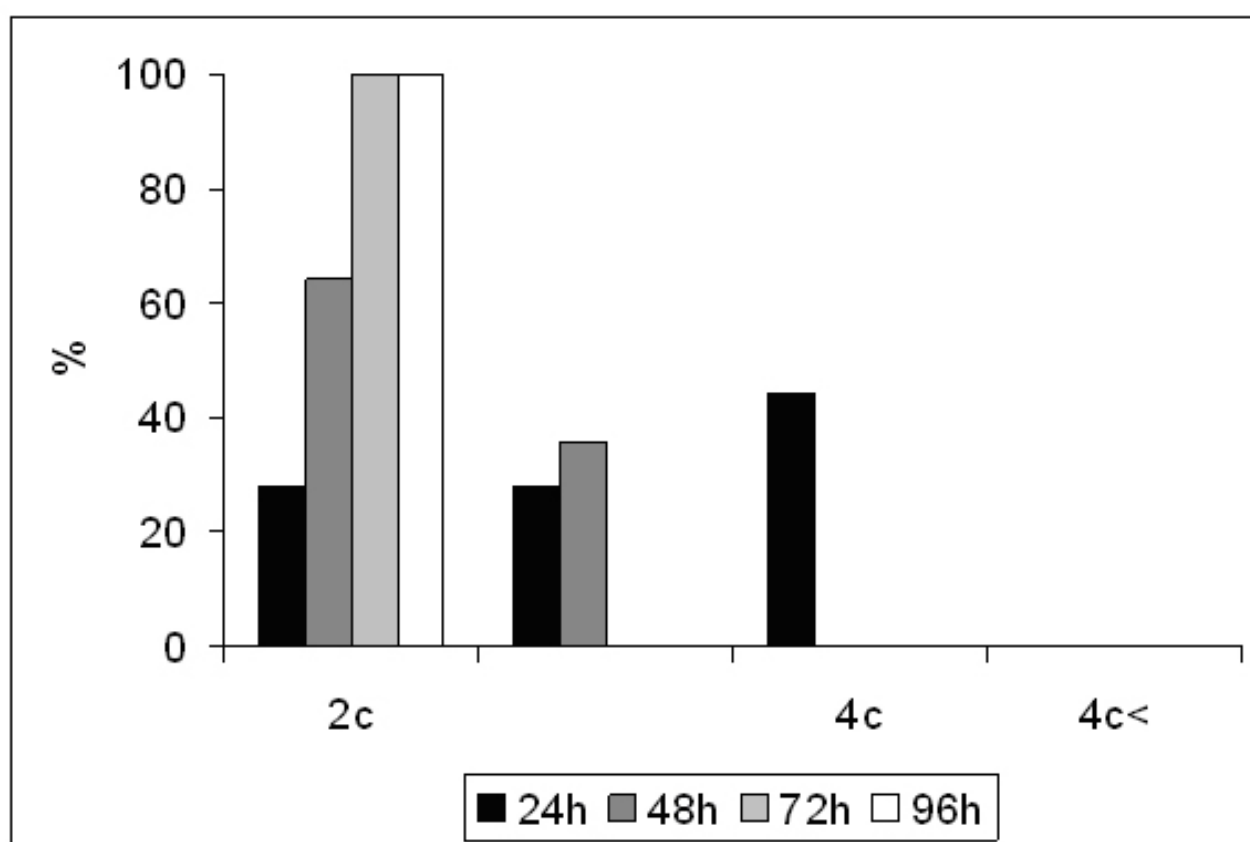


Рисунок 7. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах ранних миелоидных клеток ПКМ свиней (суммарно) в течение 4-х суток культивирования в контроле без воздействия вируса африканской чумы.

*По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”*

*По оси ординат – частота встречаемости*



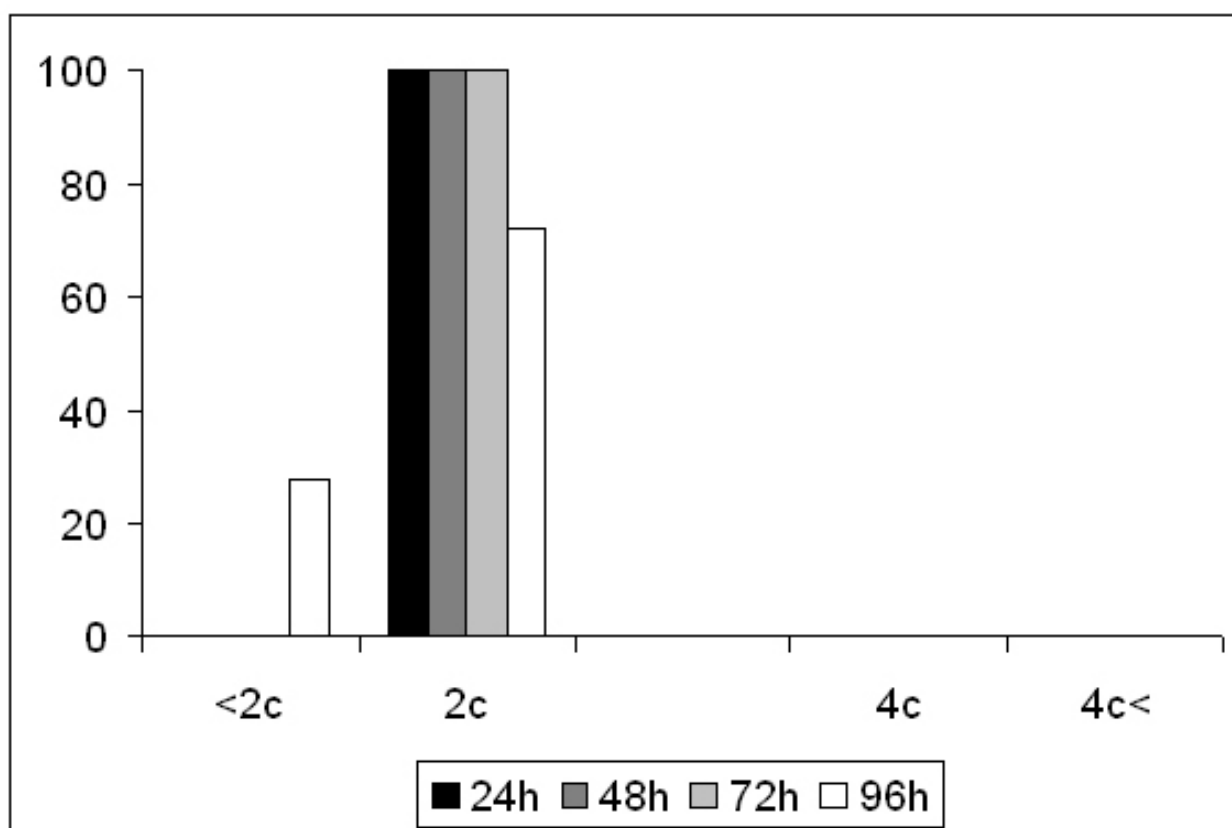


Рисунок 8. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах ранних миелоидных клеток ПККМ свиней (суммарно) в течение 4-х суток культивирования при воздействии вируса африканской чумы.

*По оси абсцисс – плоидность ядер, выраженная в единицах “с”*

*По оси ординат – частота встречаемости*

Как видно из гистограммы (рисунок 7), через 24 часа от начала культивирования популяция ранних миелоидных клеток представлена диплоидными, триплоидными и тетраплоидными клетками. При этом к 48 часам культивирования тетраплоидные клетки исчезают, а диплоидные клетки составляют более 60% популяции миелоидных клеток. Через 72 и 96 часов в первичной нестимулированной культуре костного мозга свиней определяются только диплоидные клетки. На рисунке 8 показано распределение ядер нейтрофилов по содержанию в них ДНК.

Из рисунка 8 видно, что на всех сроках культивирования нейтрофилы представлены диплоидными клетками и только через 96 часов культивирования имеется небольшой процент гиподиплоидных клеток, что свидетельствует о гибели около 30% миелоидных клеток под действием вируса АЧС.

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

Интерлейкин-17 (ИЛ-17) — гомодимерный протеин с молекулярной массой 60 кД. Продуцируется хелперными Т-лимфоцитами, их основное действие является стимулирование секреции ИЛ-6. ИЛ-8 и ГМ-КСФ эпителиальными клетками эндотелия и фибробластами (Harrington et al. 2005). Т-хелперы 17 характеризуются экспрессией ИЛ-17 (ИЛ-17А), ИЛ17F, ИЛ-6 (ИЛ-6), ФНО $\alpha$  (TNF-alpha) и ИЛ-22 (ИЛ-22).

Как следует из рисунка 9, в норме у свиней количество ИЛ-17 в периферической крови колеблется в пределах 45 – 70 пкг/мл, на начальном этапе АЧС, а затем уровень ИЛ-17 достоверно увеличивается, колеблясь в пределах 85-100 пкг/мл ( $p < 0.05$ ). На 2-3 дни уровень ИЛ-17 несколько снижается и наблюдается лишь тенденция к росту по сравнению с контролем ( $p < 0.1$ ). А на заключительном (4-6 дни) этапе заболевания уровень цитокина снижается вплоть до контрольных значений.

Интерлейкин 23 секретируется активированными терминально дифференцированными макрофагальными клетками, а именно дендритными клетками. ИЛ-23 человека стимулирует индуцированную ФГА продукцию ИНФ-гамма Т-клетками и Т-клетками памяти (Smith et al. 2007).

Как следует из рисунки 10, у здоровых свиней содержание ИЛ-23 колеблется в диапазоне от 4.5 до 7 пкг/мл.

Непосредственно после начала инфекции АЧС наблюдается тенденция к повышению содержания ИЛ-23 в сыворотке больных свиней ( $p < 0.1$ ). А начиная со 2 дни и вплоть до конца заболевания, наблюдается достоверный рост содержания данного цитокина в сыворотке крови ( $p < 0.05$ ). При этом на терминальных сроках заболевания его уровень почти в три раза превышает контрольные значения.

На рисунке 11 приведены данные по динамике сывороточных уровней гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) в динамике АЧС, а на графике 12 приведены данные по динамике сывороточных уровней гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в динамике АЧС.

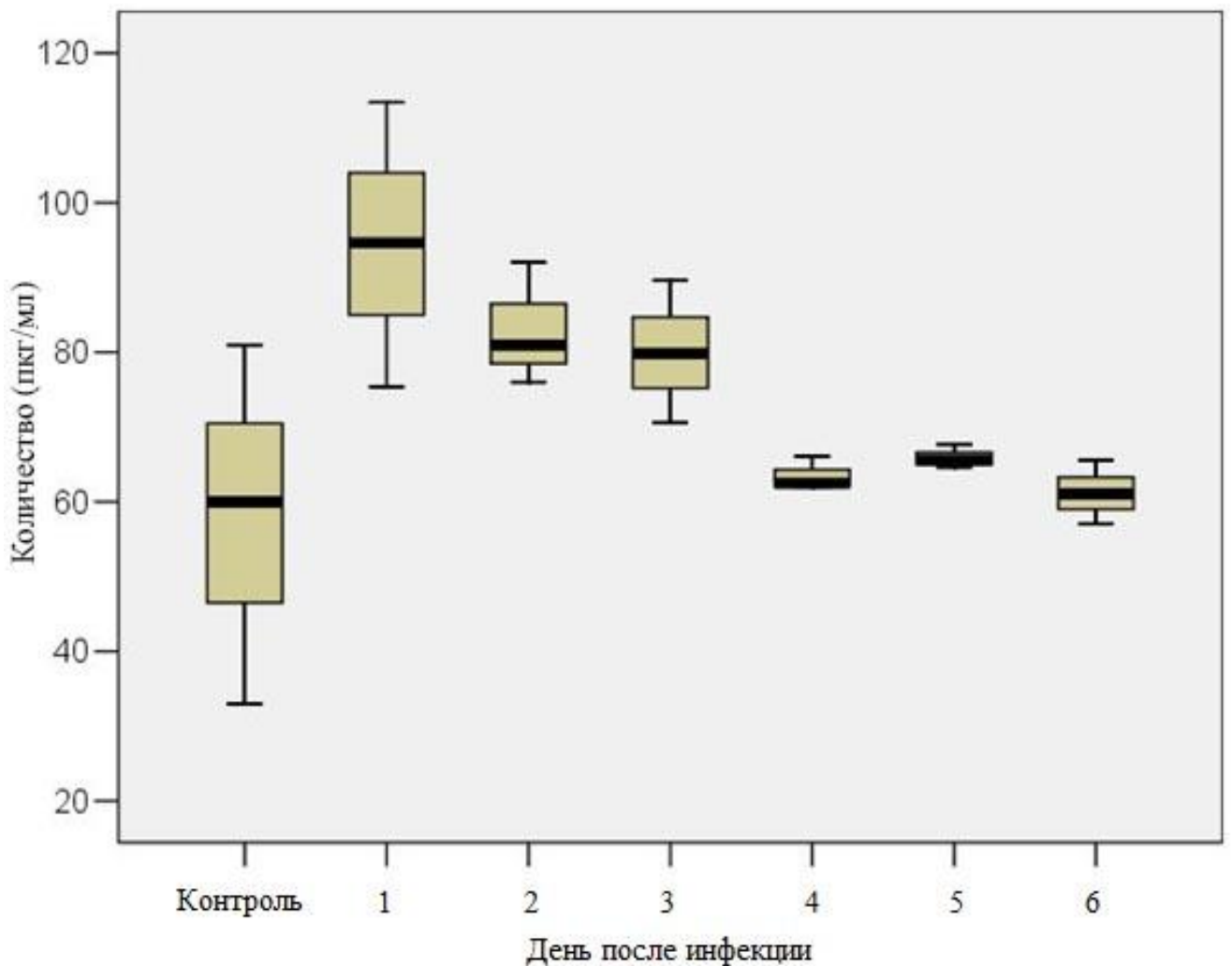


Рисунок 9. Изменение содержания ИЛ-17 в периферической крови свиней в динамике острой формы АЧС

*По оси абсцисс – сутки после заражения АЧС*

*По оси ординат – количество интерлейкина ИЛ-17 в пкг/мл*

В качестве индукторов синтеза Г-КСФ могут выступать такие провоспалительные цитокины, как TNF $\alpha$ , ИЛ-1, Г-КСФ. Последний стимулировал продукцию Г-КСФ в адгезивных (макрофагально-моноцитарных) клетках из периферической крови доноров (Козлов 2004)(Козлов 2004).

Как следует из рисунка 12 в норме у свиней уровень ГМ-КСФ колеблется в пределах 15-18 пкг/мл. При АЧС наблюдается подъем его уровня, который на 3 и 5 дни становится достоверным по сравнению с контролем. На этих сроках уровень Г-КСФ в сыворотке

превосходит контрольные значения в 4-5 раз ( $p < 0.05$ ). Для АЧС характерны резкие колебания уровней ГМ-КСФ в сыворотке.

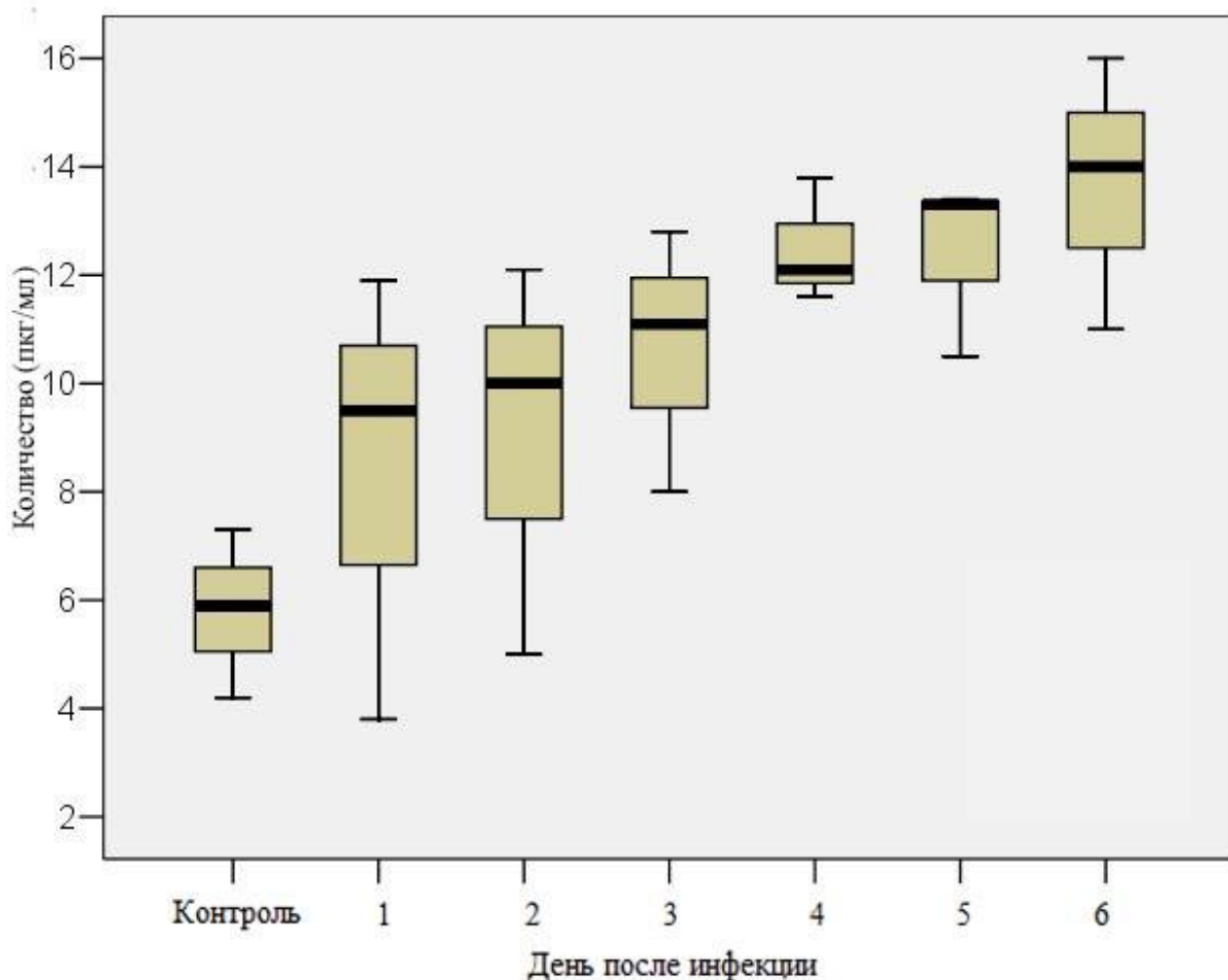


Рисунок 10. Изменение содержания ИЛ-23 в периферической крови свиней в динамике острой формы АЧС.

*По оси абсцисс – сутки после заражения АЧС*

*По оси ординат – количество интерлейкина ИЛ-17 в пг/мл*

Так на 4 дни различия по сравнению с контролем не достоверны, а на терминальной стадии заболевания (6 дни) уровень ГМ-КСФ не отличается от контрольных значений. В таблице 13 дана корреляция основных показателей состояния миелоидных клеток (популяционный анализ в крови и КМ, и размеры клеток в крови и КМ).

Для удобства общие показатели миелоидных клеток разделены между поздними клетками (палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы) и ранними клетками (от метамиелоцитов до миелобластов включительно). Как следует из таблицы 13, обратная корреляция наблюдается между популяциями ранних и поздних миелоидных клеток.

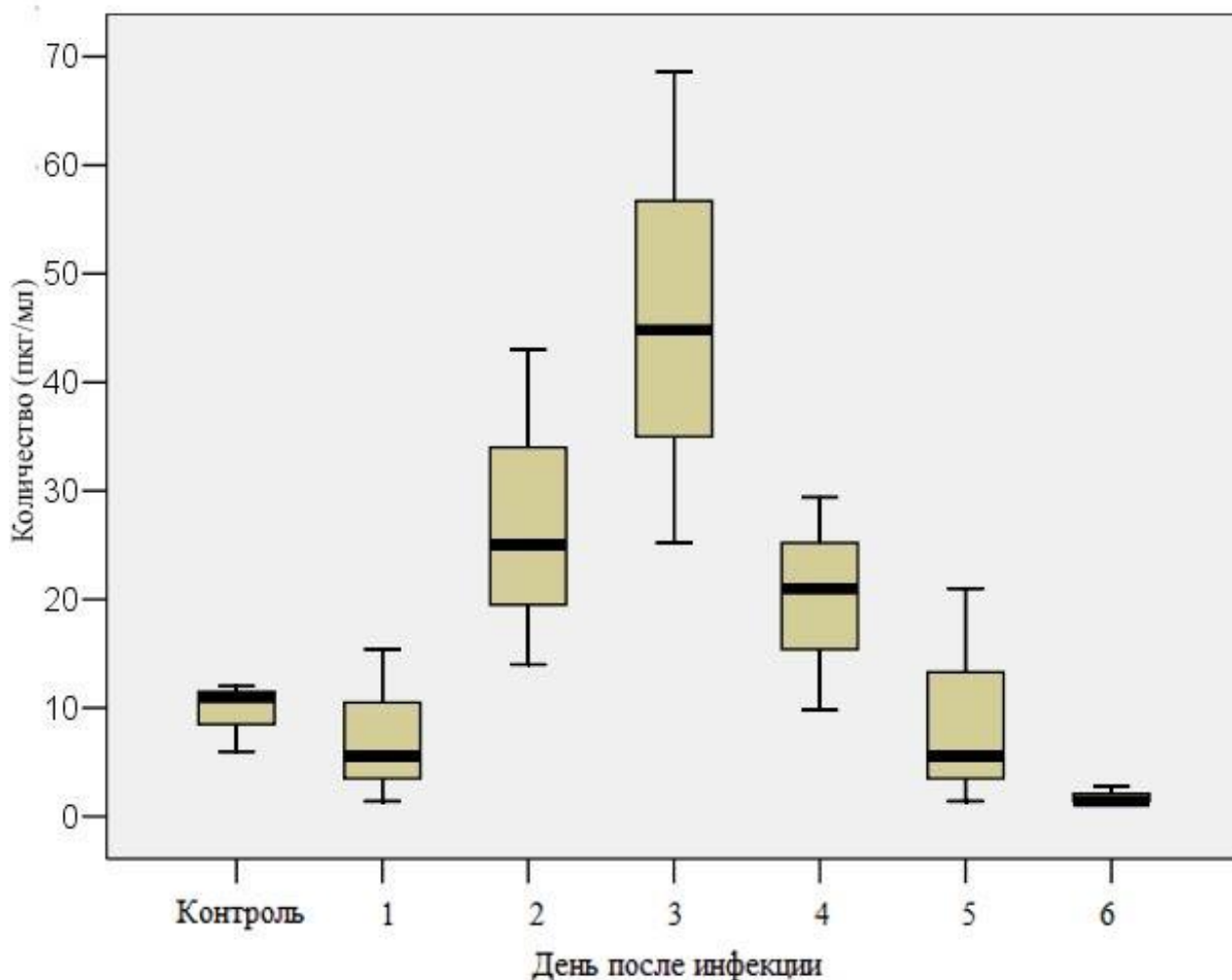


Рисунок 11. Изменение содержания гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) в периферической крови свиней в динамике острой формы АЧС.

*По оси абсцисс – сутки после заражения АЧС*

*По оси ординат – количество Г-КСФ в пкг/мл*

Наиболее информативными оказались данные по корреляции ИЛ-23 с миелоидными клетками. ИЛ-23 обратно коррелирует с численностью зрелых нейтрофилов, демонстрирует положительную корреляцию с популяцией ранних миелоидных клеток, и с площадью их

цитоплазмы (иными словами с активацией последних). Из остальных цитокинов ИЛ-17 дает положительную корреляцию с площадью цитоплазмы ранних миелоидных клеток КМ (иными словами с активацией последних). Схематизировано основные исследуемые параметры в динамике АЧС представлены на рисунке 13.

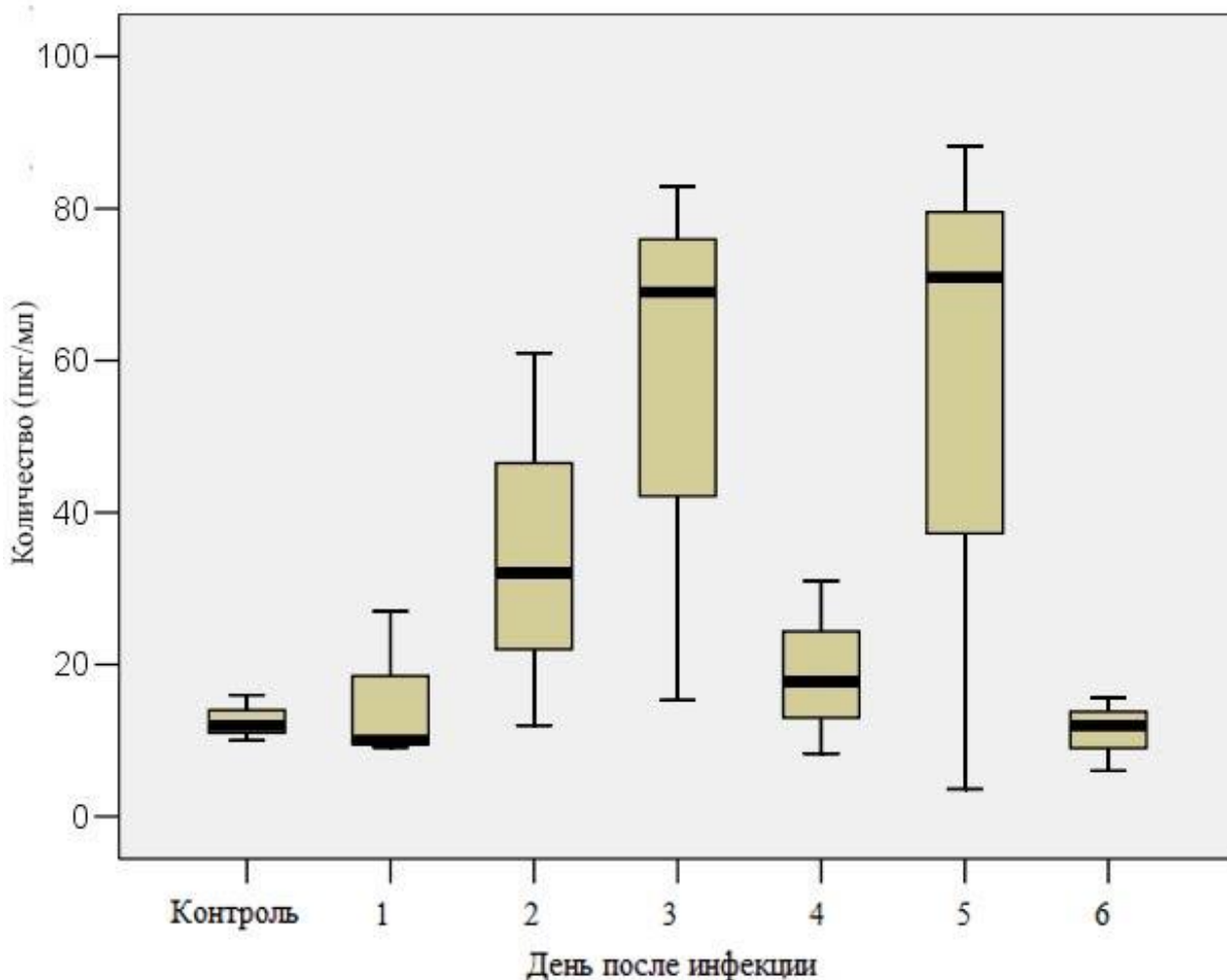


Рисунок 12. Динамика изменений содержания провоспалительного цитокина ГМ-КСФ в периферической крови свиней в динамике острой формы АЧС.

*По оси абсцисс – сутки после заражения АЧС*

*По оси ординат – количество интерлейкина ИЛ-17 в пкг/мл*

Из графика следует, что зрелые миелоидные клетки в крови и КМ снижаются практически одинаково, что свидетельствует о масштабной убыли нейтрофилов в организме свиней, начиная с начальной стадии АЧС. Увеличение доли незрелых миелоидных клеток в

крови свиней не сопровождается значимым возрастанием этой популяции в КМ. Последнее свидетельствует об ускоренном вымывании данных клеток из КМ в кровь, скорее всего для компенсации убыли.

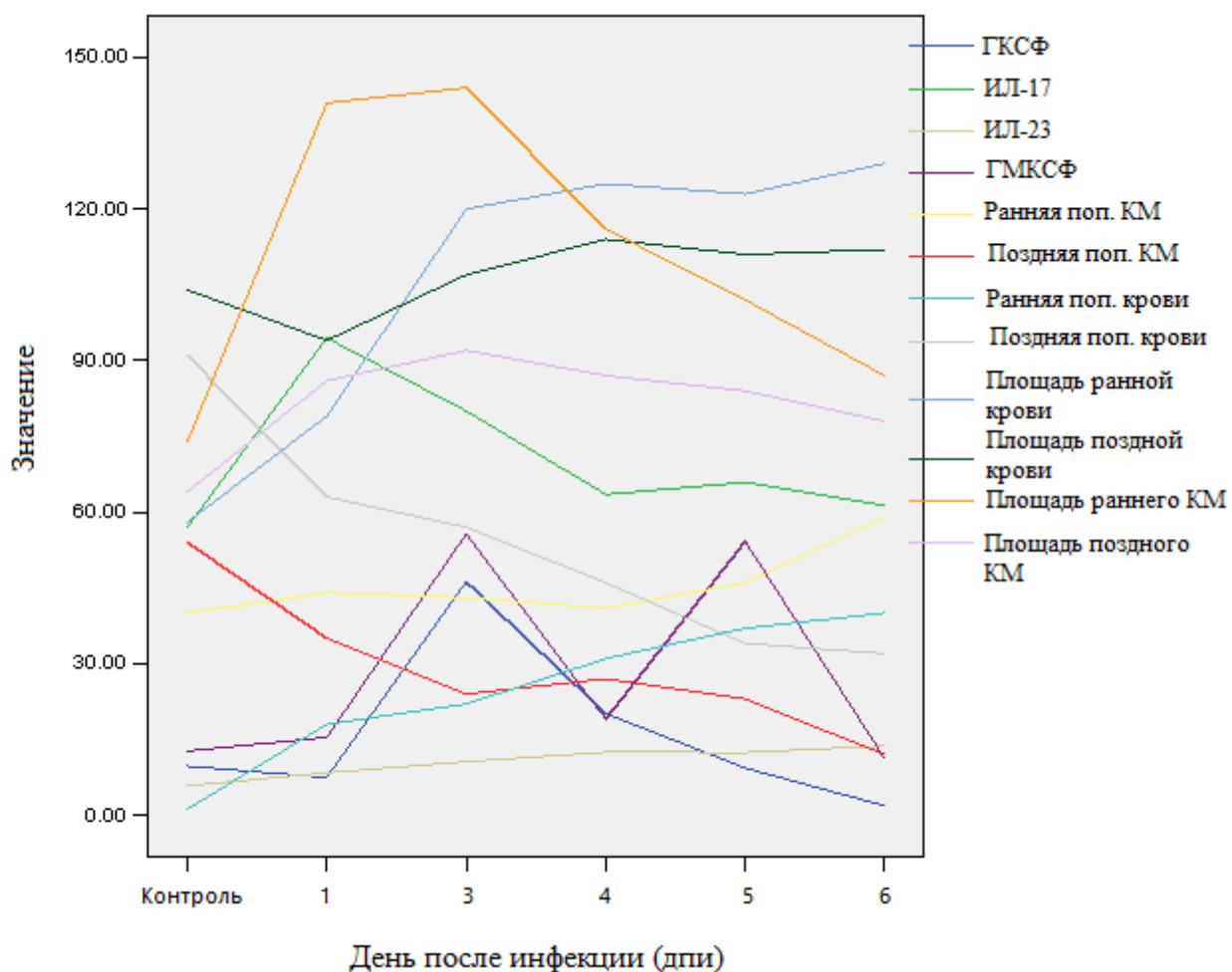


Рисунок 13. Основные исследованные параметры в динамике острой формы АЧС.

*По оси абсцисс – сутки после заражения АЧС*

*По оси ординат – количество интерлейкина ИЛ-17 в пкг/мл*

Действие цитокинов можно разобрать на две части – раннее и позднее. Ранее проявляется на начальном этапе заболевания (1 дни) – это, прежде всего резкий подъем уровня ИЛ-17, который продуцируется активированными Т-лимфоцитами (в частности Th17 клетками). Вероятнее всего именно его действием можно объяснить эффекты, происходящие в миелоидной популяции при АЧС. Как известно ИЛ-17 является важным, а возможно и важнейшим фактором, вызывающим миграцию нейтрофилов из крови в ткани (Yeh et al. 2015; Yuan et al. 2015).

Таблица 13.

Корреляция основных показателей состояния миелоидных клеток при АЧС. (популяционный анализ клеток и их размерные показатели в крови и КМ).

		ГКСФ	ИЛ-17	ИЛ-23	ГМКСФ	Популяция		Популяция		Размер цитоплазмы		Размер цитоплазмы		
						Ранний КМ	Поздний КМ	Ранняя кровь	Поздняя кровь	Ранняя кровь	Поздняя кровь	Ранний КМ	Поздний КМ	
ГКСФ	Корреляции по Пирсону	1	.264	.004	.633	-.432	-.076	-.129	.109	.250	.104	.611	.563	
	Достоверность	-	.614	.994	.177	.393	.885	.807	.837	.633	.845	.197	.244	
ИЛ-17	Корреляции по Пирсону	.264	1	-.181	.178	-.164	-.042	-.109	.061	-.138	-.742	.874*	.612	
	Достоверность	.614	-	.732	.736	.757	.936	.838	.908	.794	.091	.023	.197	
ИЛ-23	Корреляции по Пирсону	.004	-.181	1	.253	.618	-.945**	.979**	-.970**	.968**	.725	.072	.534	
	Достоверность	.994	.732	-	.629	.191	.004	.001	.001	.002	.103	.892	.275	
ГМКСФ	Корреляции по Пирсону	.633	.178	.253	1	-.191	-.301	.250	-.294	.433	.218	.410	.557	
	Достоверность	.177	.736	.629	-	.717	.563	.632	.571	.391	.679	.420	.251	
Популяция	Ранний КМ	Корреляции по Пирсону	-.432	-.164	.618	-.191	1	-.722	.663	-.650	.488	.291	-.278	-.022
		Достоверность	.393	.757	.191	.717	-	.105	.151	.162	.327	.576	.593	.967
	Поздний КМ	Корреляции по Пирсону	-.076	-.042	-.945**	-.301	-.722	1	-.940**	.943**	-.928**	-.529	-.226	-.613
		Достоверность	.885	.936	.004	.563	.105	-	.005	.005	.008	.280	.667	.196



Продолжение таблицы 13.

Корреляция основных показателей состояния миелоидных клеток при АЧС. (популяционный анализ клеток и их размерные показатели в крови и КМ).

Популяция	Ранняя кровь	Корреляции по Пирсону	-.129	-.109	.979**	.250	.663	-.940**	1	-.998**	.917*	.623	.065	.516
		Достоверность	.807	.838	.001	.632	.151	.005	-	.000	.010	.186	.902	.295
	Поздняя кровь	Корреляции по Пирсону	.109	.061	-.970**	-.294	-.650	.943**	-.998**	1	-.914*	-.590	-.107	-.548
		Достоверность	.837	.908	.001	.571	.162	.005	.000	-	.011	.218	.841	.260
Размер цитоплазмы	Ранняя кровь	Корреляции по Пирсону	.250	-.138	.968**	.433	.488	-.928**	.917*	-.914*	1	.746	.194	.638
		Достоверность	.633	.794	.002	.391	.327	.008	.010	.011	-	.088	.713	.173
	Поздняя кровь	Корреляции по Пирсону	.104	-.742	.725	.218	.291	-.529	.623	-.590	.746	1	-.384	.069
		Достоверность	.845	.091	.103	.679	.576	.280	.186	.218	.088	-	.452	.896
Размер цитоплазмы	Ранний КМ	Корреляции по Пирсону	.611	.874*	.072	.410	-.278	-.226	.065	-.107	.194	-.384	1	.871*
		Достоверность	.197	.023	.892	.420	.593	.667	.902	.841	.713	.452	-	.024
	Поздний КМ	Корреляции по Пирсону	.563	.612	.534	.557	-.022	-.613	.516	-.548	.638	.069	.871*	1
		Достоверность	.244	.197	.275	.251	.967	.196	.295	.260	.173	.896	.024	-

\*корреляция достоверно (p<0.05),  
\*\*корреляция достоверно (p<0.01)

Убыль нейтрофилов из периферической крови, скорее всего, является результатом действия ИЛ-17. ИЛ-23 в данном случае является синергистом, и усиливает действие ИЛ-17, что характерно для ряда воспалительных инфекционных процессов (Yeh et al. 2015).

Необходимо добавить, что действие ИЛ-17 более выражено на наиболее раннем этапе инфекционного процесса (Xu et al. 2014), что и продемонстрировано нами в связи с ранними популяционными изменениями. Следующим цитокином, влияющим на физиологические и популяционные характеристики, является Г-КСФ. Известно, что Г-КСФ является главным гемопозитическим фактором роста, регулирующим гранулоцитопоз. Г-КСФ обеспечивает пролиферацию, дифференцировку и терминальное созревание миелоидных предшественников нейтрофильных гранулоцитов, а также стимулирует разнообразные функции зрелых нейтрофилов и увеличивает продолжительность их жизни. Г-КСФ играет важную роль в регуляции гранулоцитопоза как в норме, так и в условиях активации гранулоцитопоза, например, при инфекции (Avalos 1996; Welte et al. 1996).

Нами показано, что подъем сывороточного уровня Г-КСФ происходит в разгар заболевания на 3 дни, после чего его концентрация снижается до контрольных значений. В качестве индукторов синтеза Г-КСФ могут выступать такие провоспалительные цитокины, как TNF $\alpha$ , ИЛ-1 (Козлов 2004), усиление синтеза которых наблюдается уже через 24 ч после в/м заражения свиней вирусом (Zakaryan et al. 2015). Показано, что ИЛ-17 может индуцировать синтез Г-КСФ в эпителиальных, эндотелиальных и фибробластных клетках. В подобных случаях Г-КСФ является посредником гранулоцитопоз-стимулирующего эффекта ИЛ-17 (Козлов 2004).

ИЛ-23 отвечает за дифференцировку Th17 клеток (одной из разновидностей Т-хелперов, синтезирующих ИЛ-17), по провоспалительному пути (Duvall et al. 2011). Как следует из графика 13, нами показано увеличение его содержания в крови с первых дней заболевания, которое продолжается до конца заболевания. Однако его эффект, направленный на повышение уровня ИЛ-17, оказывается весьма кратковременным, вероятно вследствие выраженной лимфопении, развивающейся в динамике АЧС (Karalyan et al. 2012; Zakaryan et al. 2015).

Для выявления возможной связи синтеза изучаемых цитокинов и колониестимулирующих факторов в организме свиней нами был проведен корреляционный анализ их сывороточных уровней в динамике АЧС. Как следует из таблицы 14, корреляционный анализ не выявил значимых связей между изучаемыми показателями.

Таблица 14

Корреляционный анализ уровней цитокинов и колониестимулирующих факторов в динамике АЧС

Цитокин	Корреляция или достоверность	ГКСФ	ИЛ-17	ИЛ-23	ГМКСФ
ГКСФ	Корреляция по Пирсону	1	.264	.004	.633
	Достоверность	-	.614	.994	.177
ИЛ-17	Корреляция по Пирсону	.264	1	-.181	.178
	Достоверность	.614	-	.732	.736
ИЛ-23	Корреляция по Пирсону	.004	-.181	1	.253
	Достоверность	.994	.732	-	.629
ГМКСФ	Корреляция по Пирсону	.633	.178	.253	1
	Достоверность	.177	.736	.629	-

На срезе ткани легкого на 3 сутки заболевания заметны многочисленные миелоидные клетки с преобладанием зрелых нейтрофилов (сегментоядерных и палочкоядерных).

Итак, как уже было сказано выше, некоторые из исследованных цитокинов вызывают миграцию нейтрофилов из периферической крови в ткани. Именно этим фактором обусловлено снижение содержания нейтрофилов в крови. Подобное явление называется

перераспределительной нейтропенией. Главной причиной перераспределительной нейтропении является переход лейкоцитов из циркулирующего пула в пристеночный (маргинальный, краевой) или тканевой.

Одним из возможных механизмов увеличения пристеночного пула нейтрофилов является повышение агрегации нейтрофилов и их адгезии к эндотелию сосудов. Мы склонны считать выявленную нами нейтропению результатом именно миграции нейтрофилов из периферической крови в ткани, так как, во-первых, по данным литературы вирус АЧС поражает нейтрофилы довольно поздно, во-вторых нами наблюдались многочисленные гранулярные лейкоциты в тканях различных органах, на относительно ранних стадиях заболевания уже на 3 день. Однако максимального количества миелоидные клетки в тканях свиньи достигают на заключительных стадиях АЧС (см. рисунок 13-16).

По данным литературы процесс перехода нейтрофилов в ткани называется диапедезом. Диапедез (от греч. διάληξις, diapedesis – проскакивание, проникновение) – выходение форменных элементов крови через морфологически стенки капилляров и мелких вен в связи с нарушением их тонуса и проницаемости. При этом нейтрофилы проходят через щели, между эндотелиальными клетками посткапиллярных венул благодаря расхождению межклеточных контактов. Диапедез обеспечивают молекулы адгезии PECAM-1, экспрессируемые как мигрирующими нейтрофилами, так и эндотелиальными клетками. По сути, диапедез является разновидностью кровотока, хорошо описанным при АЧС.

Важно отметить, что диапедез при АЧС носит не специфический характер. В ткани мигрируют не только нейтрофилы, но и все виды гранулярных лейкоцитов. Например, на рис 17 представлен срез ткани печени на 6 дни с преимущественной миграцией эозинофилов. Неспецифический характер миграции лейкоцитов свидетельствует о генерализованной форме воспалительного процесса.

Для выявления и определения степени миграции гранулярных лейкоцитов в ткани, нами использовался стандартный подсчет количества клеток на единицу площади. Каждое поле зрения соответствовало  $3780 (70 \times 54) \mu\text{m}^2$ . Для анализа использовались стандартные срезы легкого здоровых и больных АЧС свиней, окрашенных гематоксилин-эозином.

Как следует из рисунка 17. в легких здоровых свиней, гранулярные лейкоциты встречаются, достаточно редко, не более 1 клетки в 5 полях зрения. Количество гранулярных

лейкоцитов у больных АЧС свиней начинает возрастать уже с 1 дни, однако разница с контролем становится достоверной ко 2 дни. Все последующие измерения демонстрируют достоверное увеличение числа нейтрофилов в тканях легких больных АЧС свиней, по сравнению с контролем.

Необходимо отметить, что рост числа нейтрофилов продолжается и после 2 дни. Так во все последующие дни (начиная с 3 дни) число нейтрофилов в тканях легких больных АЧС свиней достоверно выше, по сравнению со 2 дни. Это свидетельствует об углублении диапедеза с развитием АЧС.

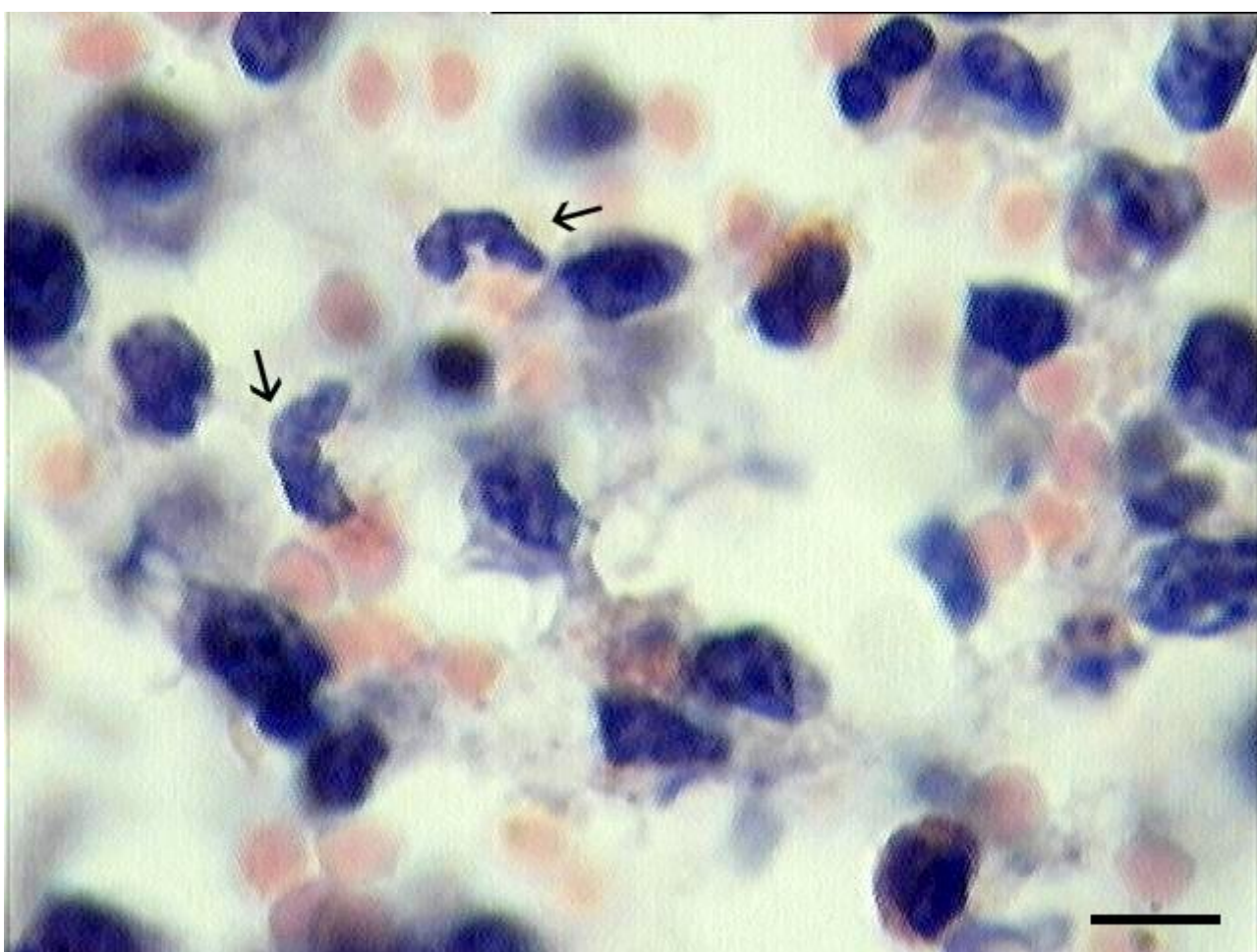


Рисунок 13. Миграция нейтрофилов в ткани. Срез ткани селезенки на 6 день заболевания АЧС. Стрелками указаны нейтрофилы.

Окраска генатоксилин-эозином. Масштаб 10µm

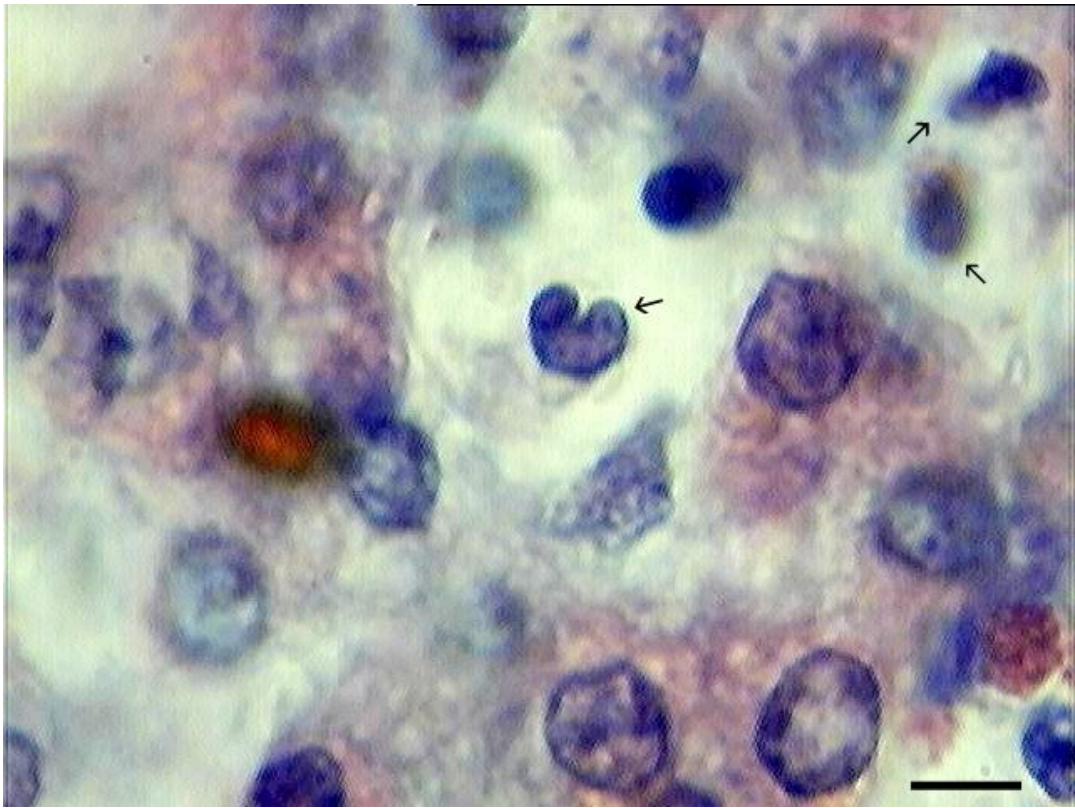


Рисунок 14. Миграция нейтрофилов в ткани. Срез ткани печени на 5 день заболевания АЧС. Стрелками указаны нейтрофилы. Окраска генатоксилин-эозином. Масштаб 10µm.

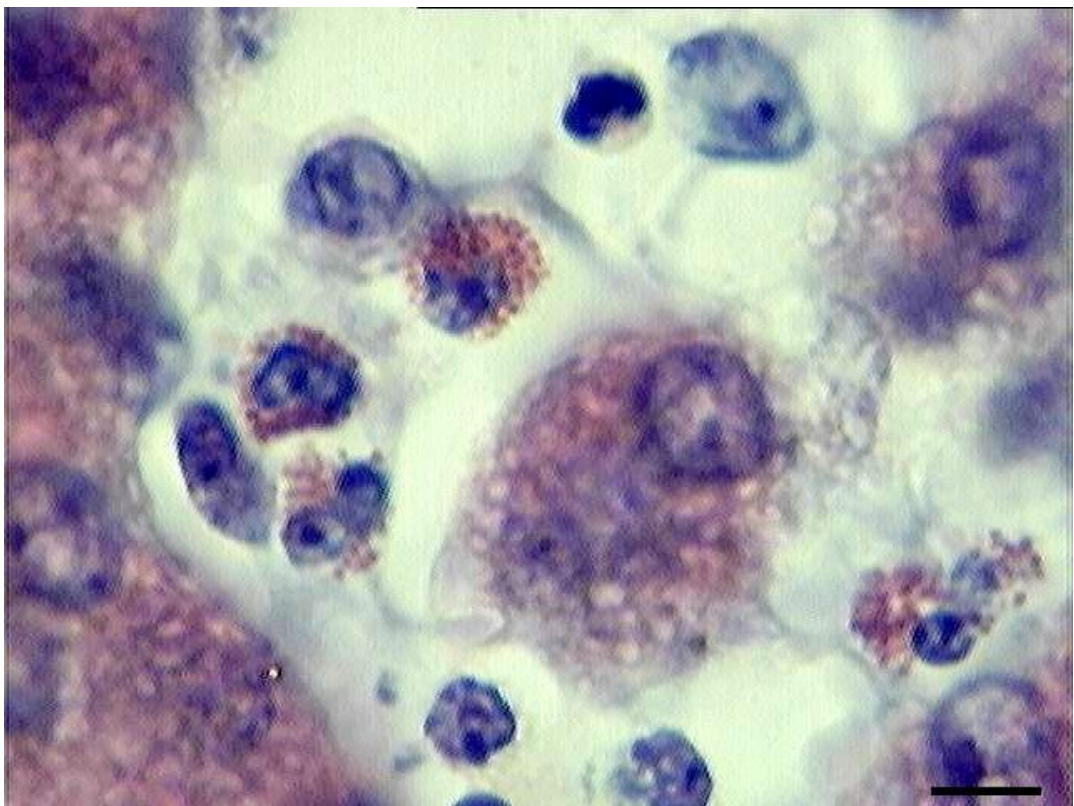


Рисунок 15. Миграция гранулярных лейкоцитов в ткани. Срез ткани печени на 6 день заболевания АЧС. Окраска гематоксилин-эозином. Масштаб 10µm.

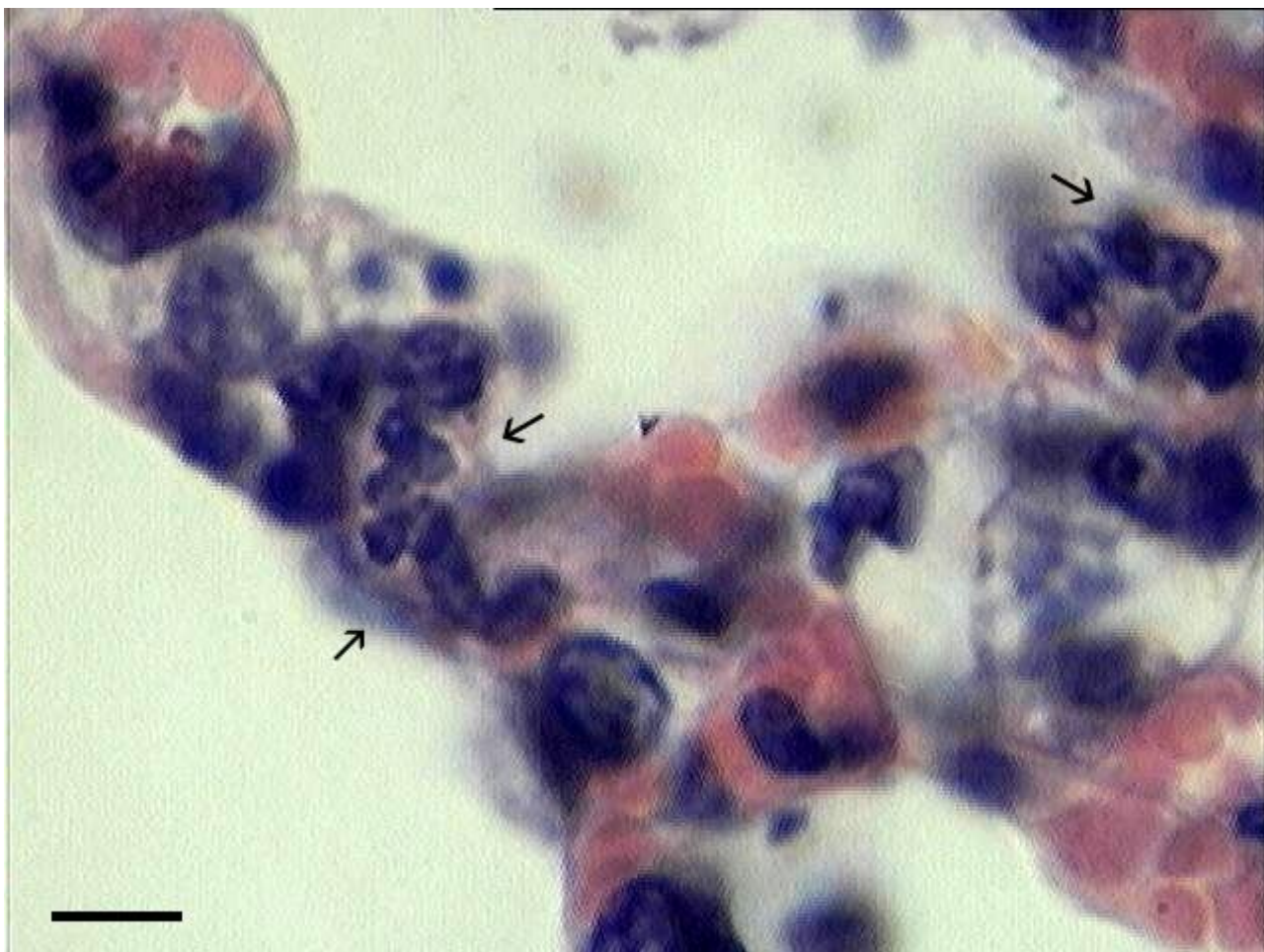


Рисунок 16. Миграция нейтрофилов в ткани. Срез ткани легкого на 6 день заболевания АЧС. Стрелками указаны нейтрофилы. Окраска гематоксилин-эозином. Масштаб 10µm.

Таким образом, при острой АЧС, возникают циркулярные нарушения кровообращения, вызванные как непрямым воздействием вируса, при этом развивается тромбоцитопения, снижение свёртывающей способности крови, общее воспаление вызывающее повышение проницаемости сосудистой стенки, так и его прямым воздействием на клетки эндотелия. Все это приводит к повышению проницаемости сосудов. В результате таких изменений возникают множественные диапедезные кровоизлияния в слизистых и серозных оболочках, коже и паренхиматозных органах. В результате поражения кровеносных сосудов микроциркуляторного русла развиваются инфаркты в селезенке. Основным клеточным элементом подобных процессов являются гранулярные лейкоциты, и в частности нейтрофилы. Последнее и является основной причиной нейтропении у свиней при АЧС.

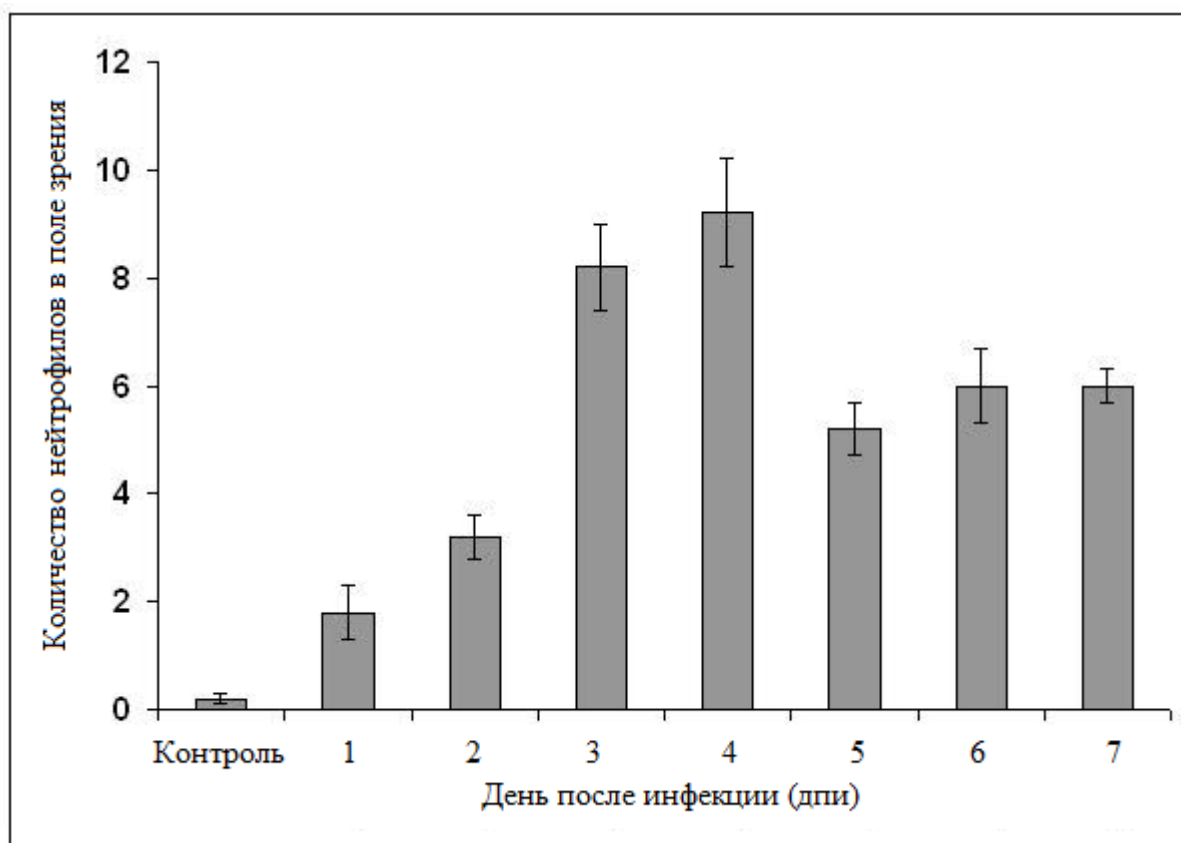


Рисунок 17. Стандартный подсчет количества нейтрофилов на единицу площади. Каждое поле зрения соответствовало  $3780 (70 \times 54) \mu\text{m}^2$ . Для анализа использовались стандартные срезы легкого здоровых и больных АЧС свиней, окрашенных гематоксилин-эозином.



## ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обобщая все вышесказанное, можно прийти к заключению, что при острой форме АЧС в миелопоэзе происходят сложные изменения, как в популяции нейтрофилов, так и в популяции ранних форм миелоидных клеток, которые отсутствуют в норме в периферической крови. При этом нами был выявлен выраженный сдвиг миелоидной популяции влево и если на 1 дни он был равен 0,3, затем, неуклонно нарастая, к завершающим стадиям достиг 2.6. Такое соотношение появляется при повышенной потребности организма животного в нейтрофильных лейкоцитах, превышающее возможности костного мозга. Сдвиг влево часто наблюдается при инфекционных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, интоксикациях, заболеваниях системы крови, а в нашем случае – при АЧС, что может иметь прогностическое значение. Достоверное снижение числа нейтрофилов, которое начинается с третьих суток, вероятнее всего связано с тем, что пролиферативная фаза миелопоэза начинает меняться дегенеративной несмотря на преобладание ранних форм – палочкоядерных нейтрофилов и более ранних форм вплоть до миелобластов.

Это свидетельствует о завершении и/или несостоятельности компенсаторной фазы миелопоэза, а, следовательно, и углублении патологического процесса. Нейтрофилия, описанная рядом авторов (Wardley & Wilkinson 1977), в наших экспериментах несмотря на значительное повышение содержания незрелых форм не наблюдается в виду резкого снижения общего числа клеток миелоидного ряда. При этом, происходит достоверное увеличение содержания мертвых и разрушающихся клеток, число которых на терминальной стадии составляет около половины популяции клеток периферической крови свиней. На недостаточность пролиферативных механизмов указывает и снижение содержания всех клеток крови – панцитопения, что свидетельствует о несостоятельности компенсаторной фазы лейкопоэза и вследствие компенсаторных, а затем дегенеративных процессов в КМ наблюдается опустошение паренхимы.

Наши данные по изучению миелограммы показали, что индекс сдвига нейтрофилов, в КМ свиней, начиная со 2 дни колеблется в пределах 2.1-3.6, что свидетельствует о тяжелом функциональном угнетении костного мозга.

Нами впервые выявлены патологические миелоидные клетки при инфекции АЧС, которые были обнаружены как в костном мозге, так и в периферической крови. Из литературы известно, что в случае какой-либо патологии со стороны системы крови, прежде всего при острых лейкозах, в миелограмме можно обнаружить достаточно большое количество клеток, которые являются патологическими по своей структуре. Наличие патологических нейтрофилов, которые не встречаются у здоровых особей, может свидетельствовать о сильно выраженной воспалительной составляющей данного заболевания (Cho et al. 2009).

В периферической крови и КМ их появление отмечается с 3 дни, а пика количество патологических нейтрофилов достигает к терминальной стадии заболевания (5-7 дни). Появление патологических нейтрофилов чаще связывают с патологическим ответом на активацию иммунной системы, возникающую при некоторых заболеваниях (Pattengale et al. 1974; Yata et al. 1973). Однако нами показаны при АЧС патологические нейтрофилы в условиях *in vitro* уже на 1 дни, что свидетельствует о наличии независимого от иммунной стимуляции организма механизма возникновения патологических клеток.

По нашим данным в условиях *in vitro* показаны различные механизмы формирования патологических клеток. При первом из них происходит фрагментация ядра вследствие его перешнуровки, а при втором происходит синтез дополнительной ДНК в ядре. В контрольной культуре КМ патологические клетки возникают лишь по первому варианту, а в условиях инфицирования вирусом АЧС по обоим.

Следовательно, мы можем полагать, что «классические» патологические лимфоциты и нейтрофилы с повышенным содержанием ДНК в ядре являются результатом вирусной инфекции. Такие клетки обнаруживаются нами в КМ, периферической крови и в первичной культуре КМ. В условиях *in vitro*, нами не выявлено значимых изменений в популяции миелоидных клеток, однако показана активация, выраженная, как и *in vivo*, в увеличении размеров клеток, и содержания РНК в цитоплазме.

В то же время изменения размеров миелоидных клеток связано, скорее всего непосредственно с вирусной инфекцией. Как показано (Ballester et al. 2010; L Carrasco, de Lara, Martín de las Mulas, et al. 1996), вирус АЧС способен поражать нейтрофилы, однако

позже, чем основные клетки-мишени. Это, в целом, совпадает с полученными нами данными.

С учетом вышесказанного, можно заключить, что популяционные изменения являются не непосредственно вирус-индуцированными, а ответной реакцией организма на вирус. Значительное уменьшение количества сегментоядерных нейтрофилов к терминальной фазе болезни в периферической крови (почти в три раза) и в КМ (более чем в 7 раз) свидетельствует о прямом их участии в защите внутренней среды организма свиней от вируса АЧС. Механизмы, запускающие популяционные изменения во всех видах миелоидных клеток крови и КМ, связаны с достоверным увеличением содержания ИЛ-17 и ИЛ-23. В пользу подобного заключения говорит и то, что увеличению концентрации этих цитокинов в сыворотке крови предшествует нейтропения.

Усиление же синтеза Г-КСФ на 3 дни, происходит после возникновения нейтропении и направлено на усиление пролиферации этих клеток, для компенсации их убыли.

Наши исследования помогают уточнить патологию иммунной системы при АЧС. Так, согласно современной концепции развития воспалительного процесса, принимаются три независимых пути его развития – ИЛ-12/IFN- $\gamma$ , ИЛ-4/ИЛ-5/ИЛ-13 и ИЛ-23/ИЛ-17 (Kohyama et al. 2007). В более ранних работах по патогенезу АЧС, рассматривались отдельные компоненты двух первых путей. В настоящей работе рассмотрен и третий путь – ИЛ-23/ИЛ-17. Надо заметить, что он более часто развивается при различных формах аутоиммунных процессов (см. например, (Burkett et al. 2015)).

На сегодняшний день об аутоиммунных процессах при АЧС известно очень мало. По существу лишь в одном докладе по АЧС, приводятся предположения об ассоциации патологических изменений с вероятными аутоиммунными процессами в организме свиней (Moura-Nunes & Nunes-Petisca 1923). Активация содержания выявленных нами в сыворотке крови интерлейкинов 17 и 23 подтверждает возникновение аутоиммунных процессов у свиней. В случае острой формы инфекции генотипом 2 аутоиммунная патология у свиней не успевает раскрыться в полной мере из-за скоротечности патологического процесса. Однако при хроническом течении болезни или при инфекциях другими генотипами вируса АЧС возможна важная роль аутоиммунных процессов в общей патологии АЧС.

## ВЫВОДЫ

1. Популяционный анализ нейтрофилов периферической крови выявил их смещение влево не только за счет возрастания соотношения палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, но и появления значительного количества ранних форм (около 50% от всех миелоидных клеток).

2. При острой форме АЧС в первые дни инфекции в условиях *in vivo* компенсаторная фаза инфекции носит кратковременный характер и сменяется декомпенсацией на более поздних сроках заболевания.

3. Основной причиной нейтропении при АЧС является миграция преимущественно зрелых гранулярных лейкоцитов в ткани (диапедез). Изменения миелоидной популяции являются не непосредственно вирус-индуцированными, а ответной реакцией организма на вирус.

4. На пике заболевания происходит активация миелоидных клеток, проявляющаяся в увеличении их размеров и содержания РНК в цитоплазме. Эти процессы наблюдаются практически во всей популяции миелоидных клеток периферической крови, КМ и ПККМ, но более выражены в метамиелоцитах и нейтрофилах.

5. При инфекции АЧС в периферической крови и в костном мозге выявлены патологические миелоидные клетки. Их обнаружение при заражении первичной культуры костного мозга свиньи вирусом АЧС свидетельствует о наличии механизма возникновения патологических клеток независимо от иммунной системы организма.

6. На раннем этапе АЧС впервые выявлено повышение сывороточных уровней ИЛ-17 и ИЛ-23.

7. Усиление синтеза Г-КСФ на 3 дни происходит после возникновения нейтропении и направлено на активацию пролиферации этих клеток для компенсации их убыли.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьева А.И., Абрамов М.Г., Бриллиант М.Д., Бронштейн М.И., Варламова Е.Ю., Виноградова Ю.Э., Воробьев П.А., Грибова И.А., Дризе Н., Колесникова А.И., Лукина Е.А., Пинкель Д., Сахибов Я.Ю., Смирнов А.Н., Тупицин Н.Н., Туркина А.Г., Френкель М., Чертков И.Л. Клетка. Руководство по гематологии 3-е изд. А. И. Воробьева, ed. // *Ньюдиамед*, Москва, 2002; pp. 28-52, 137-145.
2. Каралова Е.М., Арзуманян Г.А., Закарян О.С., Восканян Г.Е., Саркисян Х.В., Каралян З.А. Динамика изменений популяционного состава лейкоцитов периферической крови при экспериментально вызванной африканской чуме свиней. // *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(4):21–30.
3. Каралова Е.М., Восканян Г.Е., Саркисян Х.В. Патология клеток лимфоидной ткани, *in vitro* инфицированных вирусом африканской чумы свиней. // *Вопросы вирусологии*. 2011; (1):33–37.
4. Козлов В.А. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, физиологическая активность, патофизиологические и терапевтические проблемы. // *Цитокины и воспаление*. 2004; 3(2):3–15.
5. Любин Н.А., Конова Л.Б. Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у животных. // *ГСХА*, Ульяновск, 2005; pp. 43-113.
6. Макаров В.В., Малахова М.С., Власов Н.А., Чевелев С.Ф. Африканская чума свиней- модель взаимодействия патогена с системой мононуклеарных фагоцитов. // *Доклады Россельхозакадемии*. 1992; (11-12):37–44.
7. Ромейс Б., Александров В.Я., Крюкова З.И., Соколов И.И. Микроскопическая техника. И. И. Соколова, ed. // *Изд-во иностр. лит*, Москва, 1953; pp. 26-150.
8. Сароян Д.А. Популяционный анализ нейтрофилов периферической крови в динамике развития африканской чумы свиней. // *Биолог. журн. Армении*. 2015; 67(1):74–79.
9. Сароян Д.А., Симонян Л.Н., Акопян Л.А., Аброян Л.О., Аветисян А.С., Семерджян З.Б. Динамика изменений площади и содержания нуклеиновых кислот в миелоидных клетках периферической крови в процессе острой формы африканской чумы свиней. // *Фарма*. 2015; (10):32–35.
10. Abramson J.S., Hudnor H.R. Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza

- A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. // *Blood*. 1995; 85(6):1615–1619.
11. Abramson J.S., Lewis J.C., Lyles D.S., Heller K.A., Mills E.L., Bass D.A. Inhibition of neutrophil lysosome-phagosome fusion associated with influenza virus infection in vitro. Role in depressed bactericidal activity. // *Journal of Clinical Investigation*. 1982; 69(6):1393.
  12. Abramson J.S., Mills E.L., Giebink G.S., Quie P.G. Depression of monocyte and polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism and bactericidal capacity by influenza A virus. // *Infection and immunity*. 1982; 35(1):350–355.
  13. Anon European Food Safety Authority (EFSA), 2009. Scientific report on African Swine Fever submitted to EFSA prepared by Sánchez-Vizcaíno, J.M., Martínez-López, B., Martínez-Avilés, M., Martins, C., Boinas, F., Vial, L., Michaud, V. // 2009;1–141.
  14. Avalos B.R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. // *Blood, New York*. 1996; 88:761–777.
  15. azzaq Belaaouaj A., Kim K.S., Shapiro S.D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. // *Science*. 2000; 289(5482):1185–1187.
  16. Bai F., Town T., Qian F., Wang P., Kamanaka M., Connolly T.M., Gate D., Montgomery R.R., Flavell R.A., Fikrig E. IL-10 signaling blockade controls murine West Nile virus infection. // *PLoS pathogens*. 2009; 5(10):e1000610.
  17. Bainton D.F., Ulliyot J.L., Farquhar M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow origin and content of azurophil and specific granules. // *The Journal of experimental medicine*. 1971; 134(4):907–934.
  18. Ballester M., Galindo-Cardiel I., Gallardo C., Argilagué J.M., Segalés J., Rodríguez J.M., Rodríguez F. Intranuclear detection of African swine fever virus DNA in several cell types from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a new in situ hybridisation protocol. // *Journal of virological methods*. 2010; 168(1):38–43.
  19. Beltrán-Alcrudo D., Lubroth J., Depner K., De La Rocque S. African swine fever in the Caucasus. // *FAO Empres Watch*. 2008;1–8.
  20. Blome S., Gabriel C., Dietze K., Breithaupt A., Beer M. High virulence of african swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. // *Emerging Infectious*

- Diseases*. 2012; 18(4):708.
21. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. // *Immunity*. 2010; 33(5):657–670.
  22. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. // *Trends in immunology*. 2007; 28(8):340–345.
  23. Bradley L.M., Douglass M.F., Chatterjee D., Akira S., Baaten B.J.G. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling. // *PLoS pathogens*. 2012; 8(4):e1002641.
  24. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. // *Science*. 2004; 303(5663):1532–1535.
  25. Broaddus V.C., Boylan A.M., Hoeffel J.M., Kim K.J., Sadick M., Chuntharapai A., Hebert C.A. Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy. // *The Journal of Immunology*. 1994; 152(6):2960–2967.
  26. Burkett P.R., zu Horste G.M., Kuchroo V.K. Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity. // *Journal of Clinical Investigation*. 2015; 125(6):2211.
  27. Carrasco L., Chacón-M De Lara F., Martín De Las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Wilkinson P.J., Sierra M. a. Virus association with lymphocytes in acute African swine fever. // *Veterinary Research*. 1996; 27(3):305–312.
  28. Carrasco L., Fernández a, Gómez Villamandos J.C., Mozos E., Méndez a, Jover a Kupffer cells and PIMs in acute experimental African swine fever. // *Histology and histopathology*. 1992; 7(3):421–425.
  29. Carrasco L., Gómez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Martín De Las Mulas J., Villeda C.J., Wilkinson P.J., Sierra M. a. In vivo replication of African swine fever virus (Malawi '83) in neutrophils. // *Veterinary Research*. 1996; 27(1):55–62.
  30. Carrasco L., de Lara F.C., Gómez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Villeda C.J., Wilkinson P.J., Sierra M. a The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African swine fever. // *Research in veterinary science*. 1996; 61(3):193–198.
  31. Carrasco L., de Lara F.C., Martín de las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Pérez J., Wilkinson P.J., Sierra M. a Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. // *Journal of comparative pathology*. 1996; 115(4):415–428.

32. Casal I., Enjuanes L., Vinuela E. Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African swine fever virus in vitro. // *Journal of virology*. 1984; 52(1):37–46.
33. Cavallazzi R., Bennin C.-L., Hirani A., Gilbert C., Marik P.E. Review of A Large Clinical Series: Is the Band Count Useful in the Diagnosis of Infection? An Accuracy Study in Critically Ill Patients. // *Journal of intensive care medicine*. 2010; 25(6):353–357.
34. Cheville N.F., Mengeling W.L. The pathogenesis of chronic hog cholera (swine fever). Histologic, immunofluorescent, and electron microscopic studies. // *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1969; 20(3):261–274.
35. Cho H., Hur H.W., Kim S.W., Kim S.H., Kim J.H., Kim Y.T., Lee K. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2009; 58(1):15–23.
36. Clark J.D., Baldwin R.L., Bayne K.A., Brown M.J., Gebhart G.F., Gonder J.C., Gwathmey J.K., Keeling M.E., Kohn D.F., Robb J.W. Guide for the care and use of laboratory animals. // *Washington, DC: Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council*. 1996; 125.
37. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., others Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. // *Nature medicine*. 2007; 13(4):463–469.
38. Coffin J.M., Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B., Straus S.E. Fundamental virology. // *Fundamental Virology*. 1996;
39. Coggins L. African swine fever pathogenesis. // *Prog. Med. Virol*. 1974; 18:48–63.
40. Colamussi M.L., White M.R., Crouch E., Hartshorn K.L. Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria. // *Blood*. 1999; 93(7):2395–2403.
41. Colgrove G.S. Immunofluorescence and inclusion bodies in circulating leukocytes of pigs infected with African swine fever virus. // *Bulletin of epizootic diseases of Africa*. 1968; 16(3):341.
42. Colgrove G.S., Haelterman E.O., Coggins L. Pathogenesis of African swine fever in young pigs. // *American journal of veterinary research*. 1969; 30(8):1343–1359.



43. Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. // *Blood*. 1992; 80(8):2012–2020.
44. Croker B.A., Roberts A.W., Nicola N.A. Towards a four-dimensional view of neutrophils. In *Leucocytes*. // *Springer* 2012; pp. 87-99.
45. Cua D.J., Tato C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. // *Nature Reviews Immunology*. 2010; 10(7):479–489.
46. Debets-Ossenkopp Y., Mills E.L., Van Dijk W.C., Verbrugh H.A., Verhoef J. Effect of influenza virus on phagocytic cells. // *European journal of clinical microbiology*. 1982; 1(3):171–177.
47. Detray D.E., Scott G.R. Blood changes in swine with African swine fever. // *American journal of veterinary research*. 1957; 18(68):484–490.
48. Dienz O., Rud J.G., Eaton S.M., Lanthier P.A., Burg E., Drew A., Bunn J., Suratt B.T., Haynes L., Rincon M. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. // *Mucosal immunology*. 2012; 5(3):258–266.
49. Duffy D., Perrin H., Abadie V., Benhabiles N., Boissonnas A., Liard C., Descours B., Reboulleau D., Bonduelle O., Verrier B., others Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. // *Immunity*. 2012; 37(5):917–929.
50. Duvallet E., Semerano L., Assier E., Falgarone G., Boissier M.-C. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. // *Annals of medicine*. 2011; 43(7):503–511.
51. Ekie N.F., Wilkinson P.J., Wardley R.C. Infection of pigs with the Cameroon isolate (Cam/82) of African swine fever virus. // *Journal of comparative pathology*. 1989; 100(2):145–154.
52. Elbim C., Katsikis P.D., Estaquier J. Neutrophil apoptosis during viral infections. // *The open virology journal*. 2009; 3:52.
53. Elbim C., Monceaux V., Mueller Y.M., Lewis M.G., François S., Diop O., Akarid K., Hurtrel B., Gougerot-Pocidallo M.-A., Lévy Y. Early divergence in neutrophil apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. // *The Journal of Immunology*. 2008; 181(12):8613–8623.

54. Ellson C.D., Davidson K., Ferguson G.J., O'Connor R., Stephens L.R., Hawkins P.T. Neutrophils from p40phox<sup>-/-</sup> mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. // *The Journal of experimental medicine*. 2006; 203(8):1927–1937.
55. Endo H., Akahoshi T., Takagishi K., Kashiwazaki S., Matsushima K. Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. // *Lymphokine and cytokine research*. 1991; 10(4):245–252.
56. Engelich G., White M., Hhartshorn K.L. Role of the respiratory burst in co-operative reduction in neutrophil survival by influenza A virus and Escherichia coli. // *Journal of medical microbiology*. 2002; 51(6):484–490.
57. Enjuanes L., Cubero I., Vinuela E. Sensitivity of macrophages from different species to African swine fever (ASF) virus. // *Journal of General Virology*. 1977; 34(3):455–463.
58. Fenton R.R., Molesworth-Kenyon S., Oakes J.E., Lausch R.N. Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus-induced ocular inflammation. // *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002; 43(3):737–743.
59. Fernandez a, Perez J., Carrasco L., Bautista M.J., Sanchez-Vizcaino J.M., Sierra M. a Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates. // *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*. 1992; 39(6):393–402.
60. Fernandez a, Perez J., Martin de las Mulas J., Carrasco L., Dominguez J., Sierra M. a Localization of African swine fever viral antigen, swine IgM, IgG and C1q in lung and liver tissues of experimentally infected pigs. // *Journal of comparative pathology*. 1992; 107(1):81–90.
61. Fernández a., Perez J., Carrasco L., Sierra M. a., Sanchez-Vizcaino M., Jover a. Detection of African swine fever viral antigens in paraffin-embedded tissues by use of immunohistologic methods and polyclonal antibodies. // *American Journal of Veterinary Research*. 1992; 53(8):1462–1467.
62. Ferretti S., Bonneau O., Dubois G.R., Jones C.E., Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway

- neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. // *The Journal of Immunology*. 2003; 170(4):2106–2112.
63. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. // *The Journal of cell biology*. 2007; 176(2):231–241.
64. Fujisawa H. Neutrophils play an essential role in cooperation with antibody in both protection against and recovery from pulmonary infection with influenza virus in mice. // *Journal of virology*. 2008; 82(6):2772–2783.
65. Gabriel C., Blome S., Malogolovkin A., Parilov S., Kolbasov D., Teifke J.P., Beer M. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. // *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(12):2342–2345.
66. Geering B., Simon H.U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. // *Cell Death & Differentiation*. 2011; 18(9):1457–1469.
67. Genovesi E. V, Knudsen R.C., Whyard T.C., Mebus C.A. Moderately virulent African swine fever virus infection: blood cell changes and infective virus distribution among blood components. // *American journal of veterinary research*. 1988; 49(3):338–344.
68. Le Goffic R., Leymarie O., Chevalier C., Rebours E., Da Costa B., Vidic J., Descamps D., Sallenave J.-M., Rauch M., Samson M., others Transcriptomic analysis of host immune and cell death responses associated with the influenza A virus PB1-F2 protein. // *PLoS pathogens*. 2011; 7(8):e1002202.
69. Gomez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Carrasco L., Caballero M.J., Hervás J., Villeda C.J., Wilkinson P.J., Sierra M. a. African Swine Fever Virus Infection of Bone Marrow: Lesions and Pathogenesis. // *Veterinary Pathology*. 1997; 34(2):97–107.
70. Gómez-Villamandos J.C., Carrasco L., Bautista M.J., Sierra M. a, Quezada M., Hervás J., Chacón M.D.L.F., Ruiz-Villamor E., Salguero F.J., Sónchez-Cordón P.J., Romanini S., Núñez a, Mekonen T., Méndez a, Jover a African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis. // *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. 2003; 110(4):165–169.
71. Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Méndez a, Carrasco L., Villeda C.J., Wilkinson P.J., Sierra M. a Ultrastructural study of the renal tubular system in acute experimental African

- swine fever: virus replication in glomerular mesangial cells and in the collecting ducts. // *Archives of virology*. 1995; 140(3):581–589.
72. Gomez-Villamandos J.C., Hervas J., Mendez a., Carrasco L., De las Mulas J.M., Villeda C.J., Wilkinson P.J., Sierra M. a. Experimental African swine fever: Apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. // *Journal of General Virology*. 1995; 76:2399–2405.
  73. Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Méndez a., Carrasco L., Villeda C.J., Wilkinson P.J., Sierra M. a. Pathological changes in the renal interstitial capillaries of pigs inoculated with two different strains of african swine fever virus. // *Journal of Comparative Pathology*. 1995; 112(3):283–298.
  74. Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Moreno C., Carrasco L., Bautista M.J., Caballero J.M., Wilkinson P.J., Sierra M. a. Subcellular changes in the tonsils of pigs infected with acute African swine fever virus. // *Veterinary Research*. 1997; 28(2):179–189.
  75. Gomez-Villamandos J.C., Salguero F.J., Ruiz-Villamor E., Sanchez-Cordon P.J., Bautista M.J., Sierra M.A. Classical swine fever: pathology of bone marrow. // *Veterinary Pathology Online*. 2003; 40(2):157–163.
  76. González S., Mendoza C., Sánchez-Vizcaino J.M., Alonso F. Inhibitory effect of African swine fever virus on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation. // *Veterinary immunology and immunopathology*. 1990; 26(1):71–80.
  77. Gonzalez-Dosal R., Horan K.A., Rahbek S.H., Ichijo H., Chen Z.J., Mieyal J.J., Hartmann R., Paludan S.R. HSV infection induces production of ROS, which potentiate signaling from pattern recognition receptors: role for S-glutathionylation of TRAF3 and 6. // *PLoS pathogens*. 2011; 7(9):e1002250.
  78. Greig A., Plowright W. The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. // *The Journal of hygiene*. 1970; 68(4):673–682.
  79. Hachicha M., Rathanaswami P., Naccache P.H., McColl S.R. Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. // *The Journal of Immunology*. 1998; 160(1):449–454.
  80. Haresnape J.M., Wilkinson P.J., Mellor P.S. Isolation of African swine fever virus from ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the

- African swine fever enzootic area of Malawi. // *Epidemiology and infection*. 1988; 101(1):173–185.
81. Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. Interleukin 17--producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. // *Nature immunology*. 2005; 6(11):1123–1132.
  82. Harvey J.W. Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas. // *Elsevier Health Sciences*, St. Louis, Missouri, 2012; pp. 11-48, 234-327.
  83. Hemmers S., Teijaro J.R., Arandjelovic S., Mowen K.A. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. // *PLoS One*. 2011; 6(7):e22043.
  84. Hess W.R., Howell P.G., Verwoerd D.W. African swine fever virus. // *Springer*, Vienne, 1971; pp. 1-33.
  85. Hoshino A., Nagao T., Nagi-Miura N., Ohno N., Yasuhara M., Yamamoto K., Nakayama T., Suzuki K. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via its Fc region-and complement-dependent manner. // *Journal of autoimmunity*. 2008; 31(1):79–89.
  86. Hu S., Sheng W.S., Schachtele S.J., Lokensgard J.R. Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia. // *J Neuroinflammation*. 2011; 8:123.
  87. Hufford M.M., Richardson G., Zhou H., Manicassamy B., García-Sastre A., Enelow R.I., Braciale T.J. Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8+ T Cells. // *PloS one*. 2012; 7(10):e46581.
  88. Jain N.C. Coagulation and its disorders. In Schalm's Veterinary Hematology 4th ed. // *Lea & Febiger*, Philadelphia, 1986; pp. 466-486.
  89. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., McFadden G., Kubes P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. // *Cell host & microbe*. 2013; 13(2):169–180.
  90. Karalova E.M., Sargsyan K. V, Hampikian G.K., Voskanyan H.E., Abroyan L.O., Avetisyan A.S., Hakobyan L.A., Arzumanyan H.H., Zakaryan H.S., Karalyan Z.A. Phenotypic and cytologic studies of lymphoid cells and monocytes in primary culture of porcine bone

- marrow during infection of African swine fever virus. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2011; 47(3):200–204.
91. Karalyan Z., Zakaryan H., Arzumanyan H., Sargsyan K., Voskanyan H., Hakobyan L., Abroyan L., Avetisyan A., Karalova E. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. // *BMC veterinary research*. 2012; 8(1):18.
  92. El Kebir D., Filep J.G. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. // *The Scientific World Journal*. 2010; 10:1731–1748.
  93. Kennedy A.D., DeLeo F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. // *Immunologic Research*. 2009; 43:25–61.
  94. Kiefer G. Recent developments in galloxyanine-chrome alum staining. In Introduction to quantitative cytochemistry. // *Academic Press New York* 1970; pp. 199.
  95. Kleiboeker S.B. Swine fever: classical swine fever and African swine fever. // *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2002; 18(3):431–451.
  96. Knudsen R.C., Genovesi E. V In vivo and in vitro effects of moderately virulent African swine fever virus on mitogenesis of pig lymphocytes. // *Veterinary immunology and immunopathology*. 1987; 15(4):323–336.
  97. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Somerville G.A., Braughton K.R., Malech H.L., Musser J.M., DeLeo F.R. An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. // *Journal of leukocyte biology*. 2003; 73(2):315–322.
  98. Kohyama S., Ohno S., Isoda A., Moriya O., Belladonna M.L., Hayashi H., Iwakura Y., Yoshimoto T., Akatsuka T., Matsui M. IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17. // *The Journal of Immunology*. 2007; 179(6):3917–3925.
  99. Kownatzki E., Kapp A., Uhrich S. Novel neutrophil chemotactic factor derived from human peripheral blood mononuclear leucocytes. // *Clinical and experimental immunology*. 1986; 64(1):214.
  100. Larson H.E., Parry R.P., Gilchrist C., Luquetti A., Tyrrell D.A. Influenza viruses and staphylococci in vitro: some interactions with polymorphonuclear leucocytes and epithelial cells. // *British journal of experimental pathology*. 1977; 58(3):281.
  101. Larson H.E., Parry R.P., Tyrrell D.A.J. Impaired polymorphonuclear leucocyte chemotaxis

- after influenza virus infection. // *British journal of diseases of the chest*. 1980; 74:56–62.
102. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. // *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7(9):678–689.
  103. Lindemans C.A., Coffe P.J., Schellens I.M.M., de Graaff P.M.A., Kimpen J.L.L., Koenderman L. Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. // *The Journal of Immunology*. 2006; 176(9):5529–5537.
  104. Lusitani D., Malawista S.E., Montgomery R.R. Calprotectin, an abundant cytosolic protein from human polymorphonuclear leukocytes, inhibits the growth of *Borrelia burgdorferi*. // *Infection and immunity*. 2003; 71(8):4711–4716.
  105. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. // *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11(8):519–531.
  106. Marcos V., Zhou Z., Yildirim A.Ö., Bohla A., Hector A., Vitkov L., Wiedenbauer E.-M., Krautgartner W.D., Stoiber W., Belohradsky B.H., others CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. // *Nature medicine*. 2010; 16(9):1018–1023.
  107. Martins C., Mebus C., Scholl T., Lawman M., Lunney J. Virus-Specific CTL in SLA-Inbred Swine Recovered from Experimental African Swine Fever Virus (ASFV) Infection. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988; 532(1):462–464.
  108. Maurer F.D., Griesemer R.A. The pathology of African swine fever; a comparison with hog cholera. // *American Journal of Veterinary Research*. 1958; 19(72):517–539.
  109. McNamara P.S., Ritson P., Selby A., Hart C.A., Smyth R.L. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. // *Archives of disease in childhood*. 2003; 88(10):922–926.
  110. Mebus C.A. African swine fever. // *Advances in virus research*. 1988; 35:251–269.
  111. Mebus C.A. Pathobiology and pathogenesis. In Becker. // *African Swine Fever*. Martinus Nijhoff, Boston, 1987; pp. 21-30.
  112. Metchnikoff E. Intracellulare Verdauung bei wirbellosen Thieren. // *Arb Zool Inst Univ wien u Zool Stat Triest*. 1883; 5:141–168.

113. Mills E.L., Debets-Ossenkopp Y., Verbrugh H.A., Verhoef J. Initiation of the respiratory burst of human neutrophils by influenza virus. // *Infection and immunity*. 1981; 32(3):1200–1205.
114. Minguéz I., Rueda A., Dominguez J., Sánchez-Vizcaíno J.M. Double labeling immunohistological study of African swine fever virus-infected spleen and lymph nodes. // *Veterinary Pathology Online*. 1988; 25(3):193–198.
115. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. // *The Journal of experimental medicine*. 2013; 210(7):1283–1299.
116. Moura-Nunes J.F., Nunes-Petisca J.L. Comm. Eur. Comm. In EUR 84.66 EN. 1923; pp. 132-142.
117. Mulligan M.S., Jones M.L., Bolanowski M.A., Baganoff M.P., Deppeler C.L., Meyers D.M., Ryan U.S., Ward P.A. Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. // *The Journal of Immunology*. 1993; 150(12):5585–5595.
118. Murtaugh M.P., Baarsch M.J., Zhou Y., Scamurra R.W., Lin G. Inflammatory cytokines in animal health and disease. // *Veterinary immunology and immunopathology*. 1996; 54(1-4):45–55.
119. Mutnal M.B., Cheeran M.C.-J., Hu S., Little M.R., Lokensgard J.R. Excess neutrophil infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice. // *Journal of neuroimmunology*. 2010; 227(1):101–110.
120. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. // *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6(3):173–182.
121. Navarini A.A., Lang K.S., Verschoor A., Recher M., Zinkernagel A.S., Nizet V., Odermatt B., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(17):7107–7112.
122. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. // *Journal of leukocyte biology*. 2011; 90(2):271–284.
123. Nourshargh S., Hordijk P.L., Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010; 11(5):366–378.



124. Oura C. a L., Powell P.P., Parkhouse R.M.E. African swine fever: A disease characterized by apoptosis. // *Journal of General Virology*. 1998; 79:1427–1438.
125. Pan I.-C. Spontaneously susceptible cells and cell culture methodologies for African swine fever virus. In African swine fever. // *Springer* 1987; pp. 81-126.
126. Papayannopoulos V., Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. // *Trends in immunology*. 2009; 30(11):513–521.
127. Pattengale P.K., Smith R.W., Perlin E. Atypical lymphocytes in acute infectious mononucleosis: identification by multiple T and B lymphocyte markers. // *New England Journal of Medicine*. 1974; 291(22):1145–1148.
128. Pauly T., Thiel H.J., Saalm A., others Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. // *Journal of general virology*. 1998; 79(1):31–40.
129. Penrith M.L., Thomson G.R., Bastos a D.S., Phiri O.C., Lubisi B. a, Du Plessis E.C., Macome F., Pinto F., Botha B., Esterhuysen J. An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa. // *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2004; 23(3):965–977.
130. Penrith M.L., Vosloo W. Review of African swine fever: transmission, spread and control. // *Journal of the South African Veterinary Association*. 2009; 80(2):58–62.
131. Pérez J., Rodríguez F., Fernández a, Martín de las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Sierra M. a Detection of African swine fever virus protein VP73 in tissues of experimentally and naturally infected pigs. // *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 1994; 6(3):360–365.
132. Pillay J., den Braber I., Vrisekoop N., Kwast L.M., de Boer R.J., Borghans J.A.M., Tesselaar K., Koenderman L. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. // *Blood*. 2010; 116(4):625–627.
133. Plowright W., Thomson G.R., Naser J.. African swine fever. In Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. // *Oxford University Press*, Cape Town, 1994; pp. 567-599.
134. Quintero J.C., Wesley R.D., Whyard T.C., Gregg D., Mebus C. a. In vitro and in vivo

- association of African swine fever virus with swine erythrocytes. // *American journal of veterinary research*. 1986; 47(5):1125–1131.
135. Rada B., Leto T.L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. // *Contributions to microbiology*. 2008; 15:164.
  136. Ratcliffe D.R., Nolin S.L., Cramer E.B. Neutrophil interaction with influenza-infected epithelial cells. // *Blood*. 1988; 72(1):142–149.
  137. Reeves E.P., Lu H., Jacobs H.L., Messina C.G.M., Bolsover S., Gabella G., Potma E.O., Warley A., Roes J., Segal A.W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K&plus; flux. // *Nature*. 2002; 416(6878):291–297.
  138. Rodríguez F., Fernández a, Martín de las Mulas J.P., Sierra M. a, Jover a African swine fever: morphopathology of a viral haemorrhagic disease. // *The Veterinary record*. 1996; 139(11):249–254.
  139. Rodriguez F., De las Mulas J.M., Herraez P., Sanchez Vizcaino J.M., Fernandez a. Immunohistopathological study of African swine fever (strain E-75)-infected bone marrow. // *Journal of Comparative Pathology*. 1996; 114(4):399–406.
  140. Rothwell S.W., Wright D.G. Characterization of influenza A virus binding sites on human neutrophils. // *The Journal of Immunology*. 1994; 152(5):2358–2367.
  141. Rouse B.T., Babiuk L.A., Henson P.M. Neutrophils are mediators of antiviral immunity. // *Experientia*. 1978; 34(3):346–348.
  142. Ruutu P., Vaheri A., Kosunen T.U. Depression of human neutrophil motility by influenza virus in vitro. // *Scandinavian journal of immunology*. 1977; 6(9):897–906.
  143. Saez-Lopez C., Ngambe-Tourere E., Rosenzweig M., Petit J.-C., Nicolas J.-C., Gozlan J. Immediate-early antigen expression and modulation of apoptosis after in vitro infection of polymorphonuclear leukocytes by human cytomegalovirus. // *Microbes and infection*. 2005; 7(9):1139–1149.
  144. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y., Misawa T., Takahama M., Kozaki T., Uehata T., Iwasaki H., Omori H., Yamaoka S., others Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. // *Cell host & microbe*. 2012; 12(1):109–116.
  145. Sakai S., Kawamata H., Mantani N., Kogure T., Shimada Y., Terasawa K., Sakai T., Imanishi N., Ochiai H. Therapeutic effect of anti-macrophage inflammatory protein 2

- antibody on influenza virus-induced pneumonia in mice. // *Journal of Virology*. 2000; 74(5):2472–6.
146. Salguero F.J., Ruiz-Villamor E., Bautista M.J., Sanchez-Cordon P.J., Carrasco L., Gomez-Villamandos J.C. Changes in macrophage in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002; 90(1-2):11–22.
147. Sanchez-Cordon P.J., Nunez A., Salguero F.J., Pedrera M., De Marco M.F., Gomez-Villamandos J.C. Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: role of macrophages and cytokines. // *Veterinary Pathology Online*. 2005; 42(4):477–488.
148. Sánchez-Cordón P.J., Romanini S., Salguero F.J., Ruiz-Villamor E., Carrasco L., Gómez-Villamandos J.C. A histopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of the intestine in pigs inoculated with classical swine fever virus. // *Veterinary Pathology Online*. 2003; 40(3):254–262.
149. Savill J., Dransfield I., Gregory C., Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. // *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2(12):965–975.
150. Savill J.S., Wyllie A.H., Henson J.E., Walport M.J., Henson P.M., Haslett C.H. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. // *Journal of Clinical Investigation*. 1989; 83(3):865.
151. Schmitz N., Kurrer M., Bachmann M.F., Kopf M. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. // *Journal of virology*. 2005; 79(10):6441–6448.
152. Segal A.W. How neutrophils kill microbes. // *Annual review of immunology*. 2005; 23:197.
153. Segovia J., Sabbah A., Mgbemena V., Tsai S.-Y., Chang T.-H., Berton M.T., Morris I.R., Allen I.C., Ting J.P.-Y., Bose S. TLR2/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. // *PloS one*. 2012; 7(1):e29695.
154. Seki M., Kohno S., Newstead M.W., Zeng X., Bhan U., Lukacs N.W., Kunkel S.L., Standiford T.J. Critical role of IL-1 receptor-associated kinase-M in regulating chemokine-

- dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia. // *The journal of immunology*. 2010; 184(3):1410–1418.
155. Seo S.-U., Kwon H.-J., Ko H.-J., Byun Y.-H., Seong B.L., Uematsu S., Akira S., Kweon M.-N. Type I interferon signaling regulates Ly6Chi monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. // *PLoS pathogens*. 2011; 7(2):e1001304.
156. Sierra M. a, Quezada M., Fernandez a, Carrasco L., Gomez-Villamandos J.C., Martin de las Mulas J., Sanchez-Vizcaino J.M. Experimental African swine fever: evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney. // *Veterinary pathology*. 1989; 26(2):173–176.
157. Sierra M.A., Bernabé A., Mozos E., Mendez A., Jover A. Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. // *Veterinary Pathology Online*. 1987; 24(5):460–462.
158. Smith E., Zarbock A., Stark M.A., Burcin T.L., Bruce A.C., Foley P., Ley K. IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice. // *The Journal of Immunology*. 2007; 179(12):8274–8279.
159. Soehnlein O. An elegant defense: how neutrophils shape the immune response. // *Trends in immunology*. 2009; 30(11):511–512.
160. Soehnlein O., Zernecke A., Eriksson E.E., Rothfuchs A.G., Pham C.T., Herwald H., Bidzhekov K., Rottenberg M.E., Weber C., Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. // *Blood*. 2008; 112(4):1461–1471.
161. Sohnle P.G., Hunter M.J., Hahn B., Chazin W.J. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). // *Journal of Infectious Diseases*. 2000; 182(4):1272–1275.
162. Speir E., Shibutani T., Yu Z.-X., Ferrans V., Epstein S.E. Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. // *Circulation research*. 1996; 79(6):1143–1152.
163. Srivastava, Sonilika Khanna N., Saxena S.K., Singh A., Mathur A., Dhole T.N. Degradation of Japanese encephalitis virus by neutrophils. // *International journal of experimental pathology*. 1999; 80(1):17.
164. Standish A.J., Weiser J.N. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. // *The Journal of Immunology*. 2009; 183(4):2602–2609.

165. Stark M.A., Huo Y., Burcin T.L., Morris M.A., Olson T.S., Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. // *Immunity*. 2005; 22(3):285–294.
166. Stier H., Leucht W. Blood sampling from the ophthalmic venous sinus in miniature swine. // *Zeitschrift fur Versuchstierkunde*. 1980; 22(3):161–164.
167. Van Strijp J.A.G., Van Kessel K.P.M., van der Tol M.E., Fluit A.C., Snippe H., Verhoef J. Phagocytosis of herpes simplex virus by human granulocytes and monocytes. // *Archives of virology*. 1989; 104(3-4):287–298.
168. Summerfield A., Hofmann M.A., McCullough K.C. Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. // *Veterinary immunology and immunopathology*. 1998; 63(3):289–301.
169. Summerfield A., Knötig S.M., McCullough K.C. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. // *Journal of virology*. 1998; 72(3):1853–1861.
170. Susa M., König M., Saalmüller A., Reddehase M.J., Thiel H.J. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. // *Journal of virology*. 1992; 66(2):1171–1175.
171. Takamatsu H., Martins C., Escribano J.M., Alonso C., Dixon L.K., Salas M.L., Revilla Asfarviridae: Virus Taxonomy. Ninth Report of the ICTV. A. M. Q. King et al., eds. // *Elsevier, Oxford* 2011; pp. 153-162.
172. Tate M.D., Brooks A.G., Reading P.C. The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. // *Respir Res*. 2008; 9(1):57.
173. Tkalcevic J., Novelli M., Phylactides M., Iredale J.P., Segal A.W., Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. // *Immunity*. 2000; 12(2):201–210.
174. Trautwein G. Classical Swine Fever and Related Viral Infections: Pathology and pathogenesis of the disease B. Liess, ed. // *Springer*, Boston, 1988; pp. 27-54.
175. Tumpey T.M., García-Sastre A., Taubenberger J.K., Palese P., Swayne D.E., Pantin-Jackwood M.J., Schultz-Cherry S., Solórzano A., Van Rooijen N., Katz J.M. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar

- macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. // *Journal of virology*. 2005; 79(23):14933–14944.
176. Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacker W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. // *PLoS pathogens*. 2009; 5(10):e1000639.
177. Urban C.F., Reichard U., Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. // *Cellular microbiology*. 2006; 8(4):668–676.
178. Wardley R.C. Effect of African swine fever on lymphocyte mitogenesis. // *Immunology*. 1982; 46(1):215–220.
179. Wardley R.C., Wilkinson P.J. The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs. // *Archives of virology*. 1977; 55(4):327–334.
180. Wartha F., Beiter K., Normark S., Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. // *Current opinion in microbiology*. 2007; 10(1):52–56.
181. Weiss D.J., Wardrop K.J. Lymphopoiesis, Neutrophil Structure and Biochemistry. In Schalm's veterinary hematology. // *John Wiley & Sons* 2011; pp. 61-65, 263-268.
182. Welte K., Gabrilove J., Bronchud M., Platzer E., Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. // *Blood*. 1996; 88(6).
183. Witko-Sarsat V., Pederzoli-Ribeil M., Hirsh E., Sozzani S., Cassatella M.A. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. // *Trends in immunology*. 2011; 32(3):117–124.
184. Xu X., Shao B., Wang R., Zhou S., Tang Z., Lu W., Xiong S. Role of Interleukin-17 in defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection in lungs. // *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014; 7(4):809.
185. Yang D., de la Rosa G., Tewary P., Oppenheim J.J. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. // *Trends in immunology*. 2009; 30(11):531–537.
186. Yata J., Tsukimoto I., Tachibana T. Human lymphocyte subpopulations. Human thymus-lymphoid tissue (HTL) antigen-positive lymphocytes forming rosettes with sheep erythrocytes and HTL antigen-negative lymphocytes interacting with antigen-antibody-

- complement complexes. // *Clinical and experimental immunology*. 1973; 14(3):319.
187. Yeh C.-Y., Shun C.-T., Kuo Y.-M., Jung C.-J., Hsieh S.-C., Chiu Y.-L., Chen J.-W., Hsu R.-B., Yang C.-J., Chia J.-S. Activated Human Valvular Interstitial Cells Sustain Interleukin-17 Production To Recruit Neutrophils in Infective Endocarditis. // *Infection and immunity*. 2015; 83(6):2202–2212.
188. Yousefi S., Gold J.A., Andina N., Lee J.J., Kelly A.M., Kozlowski E., Schmid I., Straumann A., Reichenbach J., Gleich G.J., others Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. // *Nature medicine*. 2008; 14(9):949–953.
189. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon H.U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. // *Cell Death & Differentiation*. 2009; 16(11):1438–1444.
190. Yuan S., Zhang S., Zhuang Y., Zhang H., Bai J., Hou Q. Interleukin-17 Stimulates STAT3-Mediated Endothelial Cell Activation for Neutrophil Recruitment. // *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36(6):2340–235.
191. 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. // *Archives of virology*. 2015; 160(6):1407–1414.
192. Zhou Y.C., Wang Q., Fan X.Z., Xu L., Xu Z.W., Guo W.Z., Liu J., Chen L., Tang B. The changes of peripheral blood leucocytes subpopulation after challenge with CSFV virulent strain Shimen. // *Bing du xue bao. Chinese journal of virology*. 2009; 25(4):303–308.