

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

АКОБЯН АСТХИК ВАРДАНОВНА

ПАТОЛОГИЯ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ 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-2017

## СОДЕРЖАНИЕ

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	9
1.1 АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ. ИЗВЕСТНЫЕ ФАКТЫ.....	9
1.2 ГЕМОСТАЗ И СИСТЕМА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ .....	10
1.3 ПУТИ КОАГУЛЯЦИИ.....	11
1.4 ТРОМБОЦИТЫ.....	12
1.5 РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ВИРУСНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДКАХ.....	18
1.6 МЕГАКАРИОЦИТЫ .....	20
1.7 ПАТОЛОГИИ МЕГАКАРИОЦИТОВ.....	23
1.8 ПАТОЛОГИЯ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ .....	23
1.9 СИНДРОМ ДИССИМИНИРОВАННОГО ВНУТРИСОСУДИСТОГО СВЕРТЫВАНИЯ .....	27
1.10 КЛАССИЧЕСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПАТОЛОГИИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ И АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	31
2.1 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ .....	31
2.2 ВИРУС.....	31
2.3 ВЫДЕЛЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В МАКРОФАГИ .....	31
2.4 ТИТРАЦИЯ ВИРУСА .....	32
2.5 МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА .....	32
2.6 ЭФТАНАЗИЯ .....	33
2.7 ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ КРОВИ И ИХ ОКРАСКА .....	33
2.8 МОРФОМЕТРИЯ ТРОМБОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ТРОМБОЦИТОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ.....	34
2.9 ОКРАСКА ДНК ПО ФЕЛЬГЕНУ И ЦИТОФОТОМЕТРИЯ ДНК.....	34
2.10 ОКРАСКА РНК ГАЛЛОЦИАНИН-ХРОМОВЫМИ КВАСЦАМИ.....	35
2.11 ИЗМЕРЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАКТОРОВ КОАГУЛЯЦИИ КРОВИ .....	35
2.12 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА .....	37

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	38
3.1 ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ .....	38
3.2 ПАТОЛОГИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ.....	38
3.3 ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА РНК ТРОМБОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ .....	54
3.4 3.4 ПАТОЛОГИЯ МЕГАКАРИОЦИТОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ.....	58
3.5 3.5. НАРУШЕНИЕ ГЕМОСТАЗА В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ .....	68
3.6 ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ТПО В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ.....	74
ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	76
ВЫВОДЫ.....	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

## ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- АЧС - Африканская чума свиней
- АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время
- ВАЧС - вирус африканской чумы свиней
- ВГЛ вирусная гемморагическая лихорадка
- ВИЧ- вирус иммунодефицита человека
- ВМК- Высокмолекулярный кининоген
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ВСТ- время свертывания тромбина
- ГАД- гемадсорбционная доза
- ГАЕ - гемадсорбционная единица
- ГМКСФ гранулоцит-моноцит колонистимулирующий фактор
- ДВС - диссеминированное внутрисосудистое свертывание
- Дпи- дни после инфекции
- ИЛ - интерлейкин
- КМ - костный мозг
- КЧС - классическая чума свиней
- МК- мегакариоцит
- СМФ- система мононуклеарных фагоцитов
- ССК- система свертывания крови
- ТАФ тромбоцит активирующий фактора
- ТПО - тромбопоэтин
- ТФ тканевым фактотром
- ЦМВ- цитомегаловирус
- ЦПД- цитопатическое действие
- HLA human leukocyte antigen
- РИМ - легочные внутрисосудистые макрофаги
- РВ - протромбиновое время

# ВВЕДЕНИЕ

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Вирус африканской чумы свиней (ВАЧС) является возбудителем высококонтагиозного заболевания свиней с чрезвычайно высокой летальностью. АЧС является ДНК содержащим вирусом. Его обнаруживают в крови, лимфе, во внутренних органах, секретах и экскретах больных животных. Вирус устойчив к высушиванию и гниению; при температуре 60°C инактивируется в течение 10 минут. Заболевание, вызванное ВАЧС, зачастую приводит к летальному исходу. При острой АЧС животное погибает на 6-7 день после заражения вирусом. Инкубационный период заболевания зависит от количества поступивших в организм вирионов, состояния животного, тяжести течения. Источник возбудителя инфекции — больные животные и вирусоносители. Заражение здоровых свиней происходит при совместном содержании с инфицированными вирусоносителями. Факторы передачи возбудителя — корм, пастбища, транспортные средства, загрязнения выделениями больных животных. Использование в корм необезвреженных столовых отходов способствует распространению возбудителя. Механическими переносчиками вируса могут быть птицы, люди, домашние и дикие животные, грызуны, бывшие в контакте с больными и павшими свиньями. Резервуарами вируса в природе являются африканские дикие свиньи и клещи рода *Ornitodoros*.

На данный момент не существует метода лечения и предупреждения инфекции, вакцинация не осуществляется.

Распространенность вируса охватывает Африку, Евразию, Америку. Первые вспышки вирусии в Армении и соседней Грузии были зафиксированы в 2007 году. В нашем регионе вирус представлен 2-ым генотипом, который, как известно, вызывает острую форму этого заболевания. Несмотря на широкое распространение вируса, патогенез АЧС исследован недостаточно, а патогенез инфекции, вызванной 2-ым генотипом, не изучен вообще. В связи с этим понятна важность исследования патологии АЧС. Исследование патологии в дальнейшем может привести к разработке новых противовирусных препаратов, действие которых будет направлено на лечение и/или профилактику заболеваний АЧС.

Ведущей патологией при АЧС является нарушение гемостаза. Исследования клеток системы свертывания крови (ССК) в костном мозге и в периферической крови, а также отклонений показателей факторов свертывания проводились с начала 1980х (Edwards J. et al, 1984). Первые исследования костного мозга (КМ) при АЧС начались еще в начале XX века однако серьезные клинические исследования были осуществлены лишь в 90х годах XX века в Европе (Gómez-Villamandos J. et al, 1997). Путем выдувания костного мозга из кости зараженного животного и последующего лизирования костного мозга исследовались количественные изменения клеток костного мозга и особенности репликации вируса в зараженной клетке. Тем не менее, результаты данных работ противоречивы и комплексного исследования нарушений системы гемостаза не проделано. Так, например, одни авторы показали некроз мегакариоцитов, как основную причину развивающейся тромбоцитопении (Rodriguez F. et al, 1996a.; Rodriguez F. et al, 1996b.), в то время как другие авторы утверждают, что поражение мегакариоцитов незначительно и обнаруживается на последние сутки заболевания и, следовательно, не может быть причиной тромбоцитопении (Perez J. et, al 1997). Однако, ни одним из авторов при АЧС до сих пор не изучен фактор, регулирующий созревание мегакариоцитов и образование тромбоцитов- тромбопоэтин (ТПО).

Результаты исследований факторов свертывания крови при АЧС различными авторами не выявили особых противоречий и показали удлинение времени коагуляции по всем параметрам (Edwards J. et al, 1984.), однако некоторые показатели системы свертывания не изучены вообще. Например, при изучении фибринолитической системы не были исследованы показатели количества D-димеров, которые являются основными показателями лизиса тромбов. Необходимо отметить, что комплексного исследования всей ССК, как клеточных, так и растворимых компонентов в динамике острой АЧС, вызванной 2-ым генотипом, вовсе не проводилось.

В связи со всем вышесказанным нами предложено исследовать весь пул клеток ССК в КМ и в периферической крови, динамику их количественных и качественных изменений в течение заболевания, а также изменения показателей регулятора созревания мегакариоцитов и образования тромбоцитов ТПО, и показателей факторов свертывания и анализ полученных данных.

## ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Целью работы является изучение патогенеза клеток ССК в КМ и периферической крови при острой АЧС, вызванного 2-ым генотипом, в условиях *in vivo* и изменение показателей факторов свертывания крови в динамике заболевания.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Изучение популяционных показателей клеток ССК в КМ в при острой АЧС в условиях *in vivo* в динамике заболевания.
2. Изучение морфометрических показателей клеток и форменных элементов крови (кровяных пластинок) ССК в периферической крови *in vivo* в норме и при острой инфекции вирусом АЧС.
3. Исследование изменений показателей факторов свертывания крови в динамике заболевания
4. Изучение ТПО в динамике АЧС, как важнейшего регулятора созревания мегакариоцитов и образования тромбоцитов.

## НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Нами показано, что тромбоцитопения при острой форме АЧС вызванной 2-ым генотипом, является не непосредственно вирус-индуцированной, а ответной реакцией организма на вирус. Появление гигантских тромбоцитов а так же появление гиперплоидных форм клеток-предшественников тромбоцитов в КМ, свидетельствуют об усиленной пролиферации мегакариоцитов для восполнения количества тромбоцитов в периферической крови. Об этом так же свидетельствует колебание уровня ТПО в динамике заболевания, совпадающее с выявленными гигантскими и очень маленькими тромбоцитами. В ходе заболевания изменения показателей системы свертывания крови позволили заключить, что патология данной системы характеризуется синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС). Данное заключение подтверждает гипотезу о развитии синдрома системного иммунного ответа в ходе острой АЧС.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

В связи с отсутствием методов предупреждения и лечения АЧС, изучение ключевых аспектов патогенеза заболевания является крайне важной задачей. Предполагается, что путем воздействия на эти аспекты возможно остановить или контролировать течение заболевания. Данное системное исследование нарушения гемостаза при АЧС, вызванное 2-ым генотипом, выявило ключевые аспекты патогенеза ССК в динамике заболевания, которые в дальнейшем могут служить мишенями для лечения и контроля данного заболевания. Эти исследования уточняют как патологию системы свертывания крови при АЧС так и патологию заболевания в целом.

## АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на конференции молодых ученых “New Trends In Life Sciences” (Армения, 2016), семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА (2013-2017).

## ПУБЛИКАЦИИ

Основное содержание диссертации отражено в 5 научных публикациях.

## СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Работа изложена на 104 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 32 рисунка, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения и выводов. Список цитируемой литературы содержит 190 источника.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ. ИЗВЕСТНЫЕ ФАКТЫ

Африканская чума свиней (АЧС) одно из серьезнейших заболевание поражающее свиней (Edwards, J. et al, 1984; Penrith M. & Vosloo W., 2009). Возбудителем АЧС является *вирус африканской чумы свиней* (ВАЧС), двухцепочечный ДНК содержащий вирус с икосаэдрическим капсидом, по морфологии и свойствам похож на вирусы семейства Иридовирусов, но является единственным членом семейства Асфарвириде (*Asfarviridae*), род Асфивирус (*Asfivirus*) (Dixon L. et al, 2005). Источником заражения являются больные животные, а так же переносчик вируса клещ рода Орнитодорос (лат. *Ornithodoros* ), в которых вирус сохраняется на протяжении 5 лет (Oleaga-Pe´rez et al.,, 1990). Из-за своей способности реплицироваться в клещах, этот вирус так же называют вирусом членистоногих – арбовирус (Dixon L. et al, 2005). Размер ДНК составляет от  $170-193 \times 10^3$  п.н, имеет примерно 160 открытых рамок считывания, которые считываются с обеих нитей (Y´añez R. et al, 1995; Chapman D. et al.,, 2008; de Villiers E. et al, 2010;). Клетками-мишенями для вируса АЧС являются клетки моноцитарно-макрофагальной системы, где происходит размножение вируса. В более поздних стадиях заболевания репликация вируса обнаружена в эндотелиальных клетках стенок кровеносных сосудов. Было показано, что вход вируса в клетки осуществляется рН-зависимым, динамин-зависимым эндоцитическим путем, в котором важную роль играют клатрин, актин и холестерол (Galindo I. et al., 2015). При попадани в организм вирус входит в клетки-мишени, где сразу же экспрессируются все ферменты закодированные в геноме вируса необходимые для репликации его ДНК (Kuznar J. et al, 1980b.; Salas M., et al, 1983). После 6 часов репликации вируса в цитоплазме происходит изменение локализации транскрипции (Salas M. et al, 1986). Репликация в ядре клетки так же была обнаружена на ранних стадиях. Процесс достигает пика на 6-ой час после инфекции, а на 12-ый час репликации в ядре клеток-мишеней уже не обнаруживается (Garciaabeato R et al, 1992b; Tabares E. et al, 1979). Заболевание у домашних и диких свиней характеризуется лихорадкой, цианозом кожи, обширными геморрагиями во внутренних органах. Исход заболевания летален на 100%. Резервуаром данного заболевания являются африканские аборигенные свиньи, для которых заболевание проходит в виде персистентной толерантной

инфекции. И лишь при контакте домашних свиней с африканскими свиньями заболевание приобрело острое течение (Oleaga-Perez A. et al, 1990).

В Армении вирус циркулирует начиная с 2007 года, из-за общей границы с Грузией, где и была первая вспышка заболевания в данном регионе (*World Organization for Animal Health, 2011a*) и представлен 2-ым генотипом характеризующимся острой формой заболевания, циркулирующим так же в Мозамбике, Мадагаскаре и Замбии. (Rowlands R. et al, 2008) Острая форма АЧС характеризуется лимфопенией, нейтрофилией с пролиферацией незрелых форм этих клеток (DeTray D. et al, 1957). Несмотря на широкую распространенность АЧС, диагностика этого заболевания до сих пор затруднена и, в основном, осуществляется по основным симптомам, таким как повышенная температура, потеря аппетита и главным образом обширными геморрагиям, которые появляются на 3-4 день. Так как согласно классификации ВОЗ данное заболевание свиней входит в группу наиболее опасных заболеваний класса А, осуществляется множество работ по изучению патологических механизмов и процессов, а также ведутся разработки по созданию вакцины и противовирусных препаратов. На данный момент единственный метод предотвращения распространения заболевания это убой всего поголовья свиней в пораженной и соседних фермах, чем наносится огромный ущерб сельскому хозяйству и экономике страны в целом. По данным статистической службы Армении вследствие первой вспышки заболевания в 2007 году в целом количество поголовья сократилось на 50% и лишь после четырех лет достигло значений 2007-го года до вспышки (*Statistical Yearbook of Armenia, 2014*).

## 1.2 ГЕМОСТАЗ И СИСТЕМА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Физиологические процессы, которые обеспечивают быструю остановку кровотечения при повреждении стенки сосудов, их восстановление и утилизацию сгустков крови, а также сохранение крови в жидком состоянии в сосудистом русле объединяются в понятие гемостаза. Свертывание крови – составная часть гемостаза, служит одной из основных защитных реакций организма при угрозе кровопотерь. (Струкова С.М. 2013)

*Гемостаз включает в себя три основные системы: 1) Сосудистая; 2) Свертывающая; 3) Противосвертывающая.*

Состояние клеток и компонентов стенки сосудов определяют реактивность сосудистой системы. Клетки крови, прежде всего тромбоциты (кровяные пластинки), и плазменные факторы свертывания отвечают за функции свертывающей системы. Регуляторы свертывания, такие, как ингибиторы активированных факторов свертывания и их кофакторы; активаторы и ингибиторы фибринолиза (механизма лизиса сгустка фибрина); компоненты антикоагулянтной системы протеина С объединяются в противосвертывающую систему крови. Все системы гемостаза связаны друг с другом. Функциональным взаимодействием всех трех систем обеспечивается жидкое состояние циркулирующей крови и ее свертывание. Врожденные или приобретенные нарушения структуры и функций какой-либо части систем, входящих в гемостаз, нарушения регуляции последнего, приводят к его патологиям, которые проявляются в тромбозах, прижизненном свертывании крови в сосудах, в геморрагиях и кровоточивости. При ряде патологий, например, при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), наблюдается сочетание обоих видов нарушений гемостаза – микротромбоз и кровоточивость. Процесс гемостаза разделяют на 2 этапа: первичный и вторичный. Первичный гемостаз – это мгновенная реакция системы на повреждение сосудов. На этом этапе происходит рефлекторное сужение сосудов и активация тромбоцитов приводящая к выбросу факторов свертывания крови. Вторичный гемостаз это процесс непосредственного свертывания крови на поверхности уже активированных тромбоцитов на участке повреждения, конечным эффектом которого является образование гемостатической пробки. Известно, что вторичный гемостаз инициируется двумя разными путями: внешним и внутренним путем свертывания (Струкова С.М. 2013).

### 1.3 ПУТИ КОАГУЛЯЦИИ

Путь свертывания крови считается внешним, если активация пути начинается из-за выброса фосфолипидопротеинов поврежденными клетками сосуда или ткани. И так, вследствие повреждения сосуда, еще не активный фактор VII взаимодействует с тканевым фактотром (ТФ или тромбопластин), превращается в свою активную форму VIIa. Вместе с ТФ (ТФ-VIIa) формирует внешнюю теназу. ТФ-VIIa в свою очередь активирует фактор IX и фактор X. Фактор VII самоактивируется и вместе с тромбипластином активирует фактор X превращая его в Xa. Фактор Xa является коферментом фактора Va, образует комплекс протромбиназы,

который превращает протромбин в тромбин. Затем тромбин активирует различные факторы каскада реакций, такие как факторы V и VIII и реакции усиливаются. Но образование тромбина является ключевой точкой в каскаде реакций свертывания крови, так как тромбин превращает фибриноген в фибрин. Тромбин так же активирует фактор XIII в XIIIa, который сшивает нити фибрина в сетку, основу для образования тромба (Crawley J. et al, 2007; Mackman N. et al, 2007).

Внутренний путь свертывания крови начинается с активации внутрисосудистых факторов свертывания на поверхности активированного тромбоцита. Активация тромбоцитов является критическим компонентом активации внутреннего пути свертывания. Каскад реакций начинается с того, что на поверхности тромбоцита увеличивается количество сайтов связывания кининогена. Кининоген связывается на поверхности тромбоцита. К кининогену связывается прекаллекреин и превращается в каллекреин, который в свою очередь превращает фактор XII в XIIa. Субстратом для XIIa является фактор XI, в активации которого так же участвует тромбин. Затем активированный фактор XI (XIa) активирует свой субстрат и превращает фактор IX в IXa. Фактор IXa является кофактором фактора VIIIa в образовании комплекса «теназа» для превращения фактора X в фактор Xa. Затем начинается общий путь свертывания, первой реакцией которого является превращение протромбина (фактор II) в тромбин (фактор IIa) теназным комплексом состоящим из факторов Xa и Va. Затем тромбин превращает фибриноген (фактор I) в фибрин (фактор Ia) (Colman W. 2006; Gailani D. et al, 2007).

#### 1.4 ТРОМБОЦИТЫ

Тромбоциты являются первой линией защиты при кровотечениях вызванных повреждением сосудов и являются основной причиной образования тромбов, воспаления и неоплазии. Тромбоциты млекопитающих образуются из мембраны мегакариоцитов. По количеству циркулирующих в крови форменных элементов тромбоциты занимают первое место и играют важнейшую роль в регуляции гемостаза. (Boudreaux M., 2010). Тромбоциты являются основными компонентами первичного гемостаза или тромбоцитарно-сосудистой регуляции кровеносного русла. Активация тромбоцитов происходит при адгезии этих клеток к оголенным компонентам поврежденных частей сосудов. Адгезия происходит за счет

конститутивных мембранных белков тромбоцитов. Эти форменные элементы распластываются на участке повреждения сосуда, активируются и экспрессируют индуцибельные мембранные рецепторы, вслед за этим идет слияние (агрегация) адгезированных тромбоцитов, происходит выброс большого количества различных факторов, которые обеспечивают развитие процессов свертывания крови, а так же запускают адаптивные процессы – воспаление и репарация сосудов и тканей (Струкова С.М. 2013).

В зрелых мегакариоцитах образуются специальные структуры - демаркационные мембраны, которые путем впячивания далее отпочковываются, сами превращаясь в плазматическую мембрану тромбоцитов (Eckly A et al, 2014). Эта мембрана по своему составу похожа на мембрану мегакариоцитов и содержит в себе фосфолипиды образующие двухслойную гидрофобную оболочку. Внутри этого бислоя находятся липидные рафты богатые сфинголипидами, молекулами холестерина и малым количеством белков. Липидные рафты ответственны за мобильность тромбоцитов, а так же за усиление сигнала в первой фазе активации тромбоцита, на стадиях реакции и реорганизацию цитоскелета для нормального тромбообразования (Bodin S et al, 2005). Протеины и гликопротеины, служащие специализированными рецепторами, ответственные за тромбоцитарные реакции, локализованы как внутри липидных рафт, так и отдельно от последних, на поверхности мембраны. Так гликопротеины Ib-IX-V и GPVI, ответственные за связывание фактора фон Вилебранда и коллагена соответственно находятся непосредственно в липидном рафте, а гликопротеиновый комплекс GPIIb-IIIa, известный как интегрин  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , наиболее часто встречаемый гликопротеин, локализуется на поверхности мембраны тромбоцитов. Рецепторы GPIIb-IIIa имеют важное значение при агрегации тромбоцитов и связывании фибриногена. На поверхности тромбоцитов так же находятся рецепторы связывания ТПО. После связывания с ТПО рецептор с поверхности мембраны уходит внутрь тромбоцита. Связывание ТПО не приводит к активации тромбоцитов (Dorahy D. et al, 1996). Сообщение тромбоцитов с окружающей средой происходит, помимо рецепторов, с помощью специальной открытой канальцевой системы (ОКС) которая выходит на поверхность мембраны и уходит глубоко в цитоплазму. Через ОКС идет захват веществ, а так же высвобождение содержимого гранул активированных тромбоцитов. Так например, было показано, что альфа-

и лизосомальные гранулы высвобождают свое содержимое в ОКС при активации тромбоцитов окружающих бактерию или вирус.

Другой структурной особенностью тромбоцитов является наличие системы плотных трубочек (СПТ), которые являются остатками эндоплазматического ретикулума мегакариоцитов и находятся в непосредственной близости от микротрубочек. В отличие от ОКС, СПТ не сообщаются ни с мембраной тромбоцитов ни с гранулами внутри. Мембраны СПТ содержат циклооксигеназу и тромбоксан-синтазы и, таким образом, участвуют в синтезе простагландинов. СПТ также является сайтом связывания кальция тромбоцитами (White J. et al, 1991; White J. 2005). Тромбоциты имеют митохондрии, для обеспечения потребности в энергии обмена веществ во время агрегации и процессов секреции. Было показано что коллапс потенциала митохондриальной мембраны связан со старением тромбоцитов в циркулирующей крови (Pereira J et al, 2002). В тромбоцитах содержатся три типа гранул гетерогенных по своей морфологии и содержанию. Плотные гранулы, получившие свое название из-за плотности при изучении электронным микроскопом, являются резервуарами аденина, серотонина, кальция (70% от общего кальция в тромбоците) и неорганического фосфора (McNicol A & Israels SJ 1999; Rendu F & Brohard - Bohn B 2001). Альфа гранулы самые большие и преобладающие по количеству из всех гранул. В их центре находится темная ядроподобная структура, а по периферии - серый матрикс. В этом темном участке сконцентрированы бета-тромбоглобулин, фактор активации тромбоцитов 4, синтезируемый в мегакариоцитах, и другие белки, часть которых может быть захвачен из циркулирующей крови. Фактор 5 и фактор фон Вилебранда находятся в сером матриксе. Фибриноген, тромбосподин и фибронектин локализованы между темным и серым участками. Лизосомальные гранулы тромбоцитов содержат гликозодазы, протеазы и липазы (Bentfeld-Barker M & Bainton D 1982).

Размеры тромбоцитов свиней по данным литературы составляют от 5.3 до 12,5 мкм<sup>2</sup>. (Nafstad H. & Nafstad I 1968). Тромбоциты свиней по своей морфологии похожи на тромбоциты других домашних животных и у свиней их количество в крови примерно  $520 \pm 1.95 \times 10^3$ /мкл. (Thorn C., 2010). Количество этих форменных элементов в крови у свиней сопоставимо с их количеством у других млекопитающих, так у собак количество тромбоцитов составляет  $211-621 \times 10^3$ /мкл, у коров  $100-800 \times 10^3$ /мкл, у овец  $800-$

$1100 \times 10^3/\text{мкл}$ , у лошадей  $117-256 \times 10^3/\text{мкл}$  (Kessler U et al, 2011). Цитоплазма тромбоцитов окрашивается в синий цвет при использовании рутинной краски, а гранулы внутри цитоплазмы - в пурпурный цвет. (Harvey J., 2001). Тромбоциты большого размера или тромбоциты размером больше эритроцитов называются мега- или макротромбоциты. Часто появление аномально больших тромбоцитов у тромбоцитопенических животных предполагает усиление тромбопоэза с одной стороны, однако с другой стороны подобные клетки наблюдаются и у млекопитающих с миелодисплазией и миелопролифератическими заболеваниями. Большие тромбоциты наблюдаются и у животных, которые восстановились после тромбоцитопении (Harvey J., 2001). В работах Такатоши и др (Takatoshi K et al, 2013) было показано, что новообразовавшиеся тромбоциты по размерам больше, чем старые тромбоциты. Напротив другие авторы (Enticknap JB et al, 1970) утверждают, что, в отличие от многих других клеток организма, в процессе старения тромбоциты увеличиваются в размере. В исследовании Манучи и Шарп (Mannucci PM & Sharp AA. 1967) о корреляции размера и возраста тромбоцитов достоверной связи не найдено. В свою очередь Минтер и Инграм (Minter FM & Ingram M 1971) показали, что лишь при острой недостаточности тромбоцитов частота их распределения по размеру значительно меняется. Считается (Sudershan K et al, 1971), что размер тромбоцитов может иметь индекс пролиферации мегакариоцитов и следовательно выявление зависимости размеров от возраста тромбоцитов является крайне важной задачей. В работах Крайтмана (Kraytman M 1971) по изучению размеров тромбоцитов при различных физиологических условиях в качестве экспериментальных животных представлены собаки, а экспериментальная тромбоцитопения вызывалась несколькими методами. Было показано, что в начале тромбоцитопении у экспериментальных животных пропадают большие тромбоциты, наблюдаемые в норме (5%), в распределении тромбоцитов по размерам идет сдвиг влево (в сторону маленьких тромбоцитов). Через несколько часов наблюдается увеличение количества больших тромбоцитов, на 3-ий день их количество больше нормальных значений и это явление сохраняется на протяжении всех 7-и дней эксперимента. Авторы связывают появление гигантских и больших тромбоцитов с усиленным образованием тромбоцитов из мегакариоцитов в ответ на тромбоцитопению путем пропуска нескольких стадий созревания мегакариоцита в тромбоцит. По всем характеристикам эти гигантские тромбоциты больше

похожи на фрагменты мегакариоцитов, чем на зрелых тромбоцитов. В другом эксперименте с острой тромбоцитопенией размеры тромбоцитов уменьшались начиная с 4-го дня с одновременным увеличением этих клеток в крови. Данные результаты совпадают и с экспериментальными данными Эббе и др (Ebbe S et al, 1986) в исследованиях с крысами восстанавливающимися после тромбоцитопении. В своей работе Крайтман (Kraytman M. 1973) предполагает, что размеры тромбоцитов связаны с их возрастом, так как при тромбоцитопениях различного происхождения наблюдалось увеличение размеров тромбоцитов наряду с омоложением популяции .

Вопрос зависимости размеров и количества тромбоцитов от физиологического состояния клеток предшественников и от патологических процессов в организме до конца не изучен. Однако Джонатан и др. (Jonathan N et al, 2012) в своей обзорной статье рассмотрели все факторы влияющие на размер тромбоцитов и показали, что примерно у 300.000 пациентов принимающих химиотерапию, перед тем как происходит полное исчезновение тромбоцитов в периферической крови, в качестве компенсаторного механизма появляются большие тромбоциты, образующиеся вследствие воздействия лекарства на цитоскелот клетки-предшественника и работу микротрубочек ответственных за размер и форму этих клеток. В рассмотренных различных наследственных макротромбоцитопениях были показаны ряд генетических мутаций таких важных генов, как GPIIb $\alpha$ , GPIX, и VWF, ассоциированных с синдромом Бернара-Сулье (синдром гигантских тромбоцитов); GPIIb, ассоциированный с тромбостенией Гланцмана; NF-E2 и  $\beta$ 1-tubulin. Все эти факторы в конечном итоге влияют на формирование сетей и других цитоплазматических конструкций цитоскелота, как клеток предшественников тромбоцитов, так и самих тромбоцитов. Актиновый цитоскелот представленный филамином а, адф/н-кофилином, миозин ПА так же влияет на размер и форму тромбоцитов и их предшественников. Было показано, что мутации в генах ответственных за синтез этих факторов, проявляются в появлении больших тромбоцитов и тромбоцитопенией. В работе Такатоши и др (Takatoshi et al, 2013) было показано, что при инфекции крови (виремии и бактеремии) у больных имеет место изменение количества и размеров тромбоцитов. Более того, они показали, что эти изменения напрямую связаны с выживаемостью пациентов. Так, у больных не выживающих после заражения крови наблюдается снижение количества тромбоцитов и одновременное

увеличение среднего размера тромбоцитов, а у выживающих пациентов наблюдается обратная картина с увеличением количества и снижением размеров тромбоцитов. При исследовании ( Zeigler Z et al, 1978) тромбоцитов при различных гематологических заболеваниях было показано, что при идеопатической тромбоцитопенической пурпуре наблюдается увеличение размеров тромбоцитов наряду с количеством тромбоцитов меньше  $<50,000/\text{мкл}$ .

Впервые о трмбоцитах с повышенным колличеством РНК или ретикулоцитах говорили Инграм и Куперсмит (Ingram M, Coopersmith A. 1969). В их работе был показан новый метод окраски для определения количества РНК в тромбоцитах, что давало возможность исследовать изменение его количества при различных патологиях. После потери крови у экспериментальных животных наблюдалось снижение количества тромбоцитов в крови на 50%, совоподающее с увеличением среднего объема тромбоцитов и повышением их количества. Количество ретикулоцитов в ответ на острую кровопотерю наблюдалось с первого дня эксперимента, однако достигло максимальных значений с 5-го по 10 день и совпало с периодом повышенного количества общих тромбоцитов. Таким образом авторы показали, что при острой кровопотере или анемиях аналогично с появлением ретикулярных форм красных кровяных клеток, так же происходит компенсаторный выброс ретикулярных тромбоцитов, что является важным показателем состояния тромбопоэза и имеет диагностическую важность.

Важность измерения количества РНК в тромбоцитах была показана при заболеваниях с количественным изменением этих кровяных элементов, например тромбоцитопениях различного генеза (Kienast J, Schmitz G. 1990). Здесь использовалась новая методика флюоресцентной окраски РНК, ранее использовавшаяся для изучения ретикулярных форм красных кровяных клеток при анемиях и патологиях эритропоэза. В данной работе рассматривались:

Группа 1- гипердеструктивная тромбоцитопения, когда количество мегакариоцитов в костном мозге в норме или возрастает, но в периферической крови идет усиленное разрушение тромбоцитов

Группа 2 - гипопролиферативная тромбоцитопения, когда мегакариоциты в костном мозге исчезают или их количество значительно снижается.

Группа 3 – тромбоцитемия, случаи с повышением количества тромбоцитов более чем  $400 \times 10^9/\text{Л}$ .

В результате экспериментов было показано, что в первой группе исследуемых количество ретикулярных тромбоцитов в процентном соотношении возрастает, свидетельствуя о наличии незрелых форм тромбоцитов с излишним количеством остаточного РНК. Вместе с этим во многих работах было показано, что среднее количество тромбоцитов повышается в условиях «стрессового тромбопоэза» и показана корреляция между средним количеством тромбоцитов и количеством РНК, т.е. менее зрелых форм тромбоцитов, которые являются ответной реакцией на острую тромбоцитопению. В исследованиях случаев излечения от деструктивной тромбоцитопении было показано, что количество ретикулярных тромбоцитов возвращается в норму наряду с нормализацией количества тромбоцитов в целом.

В исследования 2-ой группы было показано, что количество общего числа ретикулярных тромбоцитов значительно снижено, однако при подсчете процентного соотношения флуоресцентных тромбоцитов к общему количеству тромбоцитов было показано незначительное отличие от контрольных значений.

В 3-ей группе было показано, что при тромбоцитозе количество ретикулярных форм тромбоцитов в процентном соотношении в пределах нормальных значений, однако абсолютно среднее значение намного выше чем в двух других группах.

## 1.5 РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ВИРУСНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДКАХ

Вирусные геморрагические лихорадки (ВГЛ) это группа особых природно-очаговых инфекционных заболеваний, характеризующихся специфическим поражением системы гемостаза, полиорганной патологией с развитием выраженных геморрагического и интоксикационного синдромов приводящие к шоку и смерти. Возбудителем этих лихорадок являются вирусы четырех семейств: Аренавирусы (вирус Ласса или Лихорадка Ласса; вирус Хунин или Аргентинская лихорадка; вирус Мачупо или Боливийская лихорадка; вирус Гуанарито или Венесуэльская лихорадка; вирус Сэбия или Бразильская лихорадка);

Буниавирусы (вирус геморрагической лихорадки с почечным синдромом; вирус лихорадки Крым-Конго; вирус лихорадки долины Рифт), Филовирусы (вирус Марбург; вирус Эбола), Флавивирусы (вирус болезни леса Киассанур (Къясанур); вирус омской геморрагической лихорадки; вирус жёлтой лихорадки; вирус лихорадки денге; вирус лихорадки курианте). Несмотря на то, что эти заболевания в некоторых патологических аспектах отличаются друг от друга, для всех них характерна тромбоцитопения (снижение количества тромбоцитов ниже нормы) и подавление иммунного ответа. При ВГЛ рассматривают несколько механизмов воздействия вируса на тромбоциты. Связывание вируса с тромбоцитами может происходить через  $\beta$ -3 и TLR рецепторы (Aslam R et al, 2006; Gavrilovskaya I et al, 2010) например, было показано, что некоторые вирусы семейства Буниавирусы связываются с тромбоцитами через  $\alpha_v\beta_3$  или  $\alpha_{IIb}\beta_3$  интегрины запуская активацию тромбоцитов и индуцируя их взаимодействие с эндотелиальными клетками. Это все в конечном итоге приводит к агрегации и уменьшению тромбоцитов в циркулирующей крови (Gavrilovskaya I et al, 1999).

При контакте инфицированных клеток с тромбоцитами может происходить активация последних. Такое наблюдается при лихорадке денге, когда при контакте с зараженной эндотелиальной клеткой тромбоцит активируется и связывается с поверхностью этой клетки. Krishnamurti C et al, 2002; Roivainen M et al, 1991; Wickham TJ et al, 1993; Berinstein A et al, 1995; Nelsen-Salz B et al, 1999; Triantafilou K et al, 2000). Интересно отметить, что аренавирусы используют  $\alpha$ -дистрогликан, не проявляя цитотоксичность для клеток-мишеней таких, как эндотелиальные клетки. Впоследствии тромбоциты связываются с зараженными эндотелиальными клетками. (Cao W et al, 1998; Kunz S et al, 2005)

Уничтожение тромбоцитов и их предшественников со стороны иммунной системы при ВГЛ так же рассмотрено. Одним возможным механизмом считается поглощение тромбоцитов и их предшественников со стороны макрофагов, как в случае с вирусом острой лихорадки и синдрома тромбоцитопении из семейства *Буниавирусы*, который связываясь с тромбоцитами приводит к их фагоцитозу в селезенке (Jin C et al, 2012). Другой механизм исчезновения тромбоцитов из циркулирующей крови это тромбоцит-лейкоцит агрегация и дальнейший фагоцитоз со стороны макрофагов. Так как активированные тромбоциты способствуют притоку лейкоцитов, в частности, нейтрофилов к участку воспаления, в этом

участке затем идет взаимодействие двух этих клеток за счет белка GPIIb тромбоцита и белка макрофаг-1 антиген на лейкоцитах, так же известного как  $\alpha_M \beta_2$  интегрин, рецептор комплимента 3, CD11B, интегрин альфа-M. По сравнению с авирулентным штаммом, при заражении вирулентным штаммом ласса вируса уровень этого интегрина в 4 раза повышен в моноцитах. (Zarata JC et al, 2013). Различные хемокины секретируемые тромбоцитами помогают направлять клетки иммунной системы в участок воспаления и связываться с эндотелиальными клетками. Аналогичным образом лиганд Р-селектина на поверхности моноцитов связывается с Р-селектином на поверхности тромбоцитов и приводит к их агрегации и поглощению со стороны макрофагов (Othman M et al, 2007). Другой путь поражения тромбоцитов при ВГЛ это уничтожение этих клеток тромбоцит-вирус ассоциированными антителами. Такое наблюдается при вирусе денге. Предполагается так же, что такие антитела могут способствовать уничтожению мегакариоцитов (Rodenhuis-Zybert IA et al, 2010; Noisakran S et al, 2012; Saito M et al, 2004; Lin CF et al, 2001).

## 1.6 МЕГАКАРИОЦИТЫ

Предшественники тромбоцитов мегакариоциты образуются в костном мозге в ходе многоступенчатых процессов дифференциации, начиная с плюрипотентных стволовых клеток до специальных прекурсоров промегакариоцитарного ростка. Ранние прогениторы мегакариоцитов сначала являются CD34 позитивными клетками с низким уровнем CD41. Затем при превращении в прямые предшественники мегакариоцитов эти клетки приобретают CD6 и CD42, а экспрессия CD41 возрастает (Italiano JE et al, 2007; Weinstein R et al, 1981; Kaushansky K 2008). Было показано, что из гематопозитических стволовых клеток мегакариопоэз идет через общих предшественников миелоидных клеток, эритроидного и мегакариоцитарного ростка (Debili N et al, 1996; Hunt P. 1995; McDonald TP & Sullivan PS 1993). Первым дифференцируемым предшественником мегакариоцитов в костном мозге является мегакариобласт, одноядерная клетка с базофильной цитоплазмой окрашивающейся в темно-синий цвет, диаметр клетки 10мкм (Italiano JE & Hartwig JH 2007; Kaushansky K 2008; Weinstein R et al, 1981). Следующий по мере созревания и наиболее легко дифференцируемый предшественник - промегакариобласт (промегакариоцит) с двумя

или четырьмя ядрами, с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением и темносиней цитоплазмой, диаметр 15-50мкм. Следующие, по мере созревания, базофильные мегакариоциты, которые вследствие множественных делений ядра больше предыдущих клеток, цитоплазма базофильна, ядро многолопастное. На следующем этапе созревания образуются клетки, цитоплазма которых окрашивается азурофильной краской в розовато-сиреневый цвет. Это зрелые мегакариоциты, большие и гиперплоидные.. Так как последние стадии созревания клеток идут через эндомитоз, клетки увеличиваются в объеме и размере, плоидность возрастает ( Winkelmann M. et al, 1987; Russell K., 2012). В мегакариоцитах дупликация ДНК начинается со значения 2N и может достигать до 128N. Согласно многочисленным исследованиям (Kobayashi Y. & Kondo M. 1999) у здоровых людей в популяции мегакариоцитов наблюдаются в основном клетки с плоидностью 16N и 32N, однако у других авторов так же были выявлены клетки с плоидностью 8N и 128N. В более новых работах было показано что у здоровых людей примерно 50% от всей популяции мегакариоцитов составляют клетки 16 N, 23% клеток с плоидностью 8 N и ниже, а 22% - 32 N и выше (Tomer A. et al, 1988). В целом мегакариоциты трудно обнаруживаемые клетки, так как их встречаемость в костном мозге составляет примерно 1 на 2000 клеток. Они хорошо дифференцируются от всех остальных клеток костного мозга так как являются самыми большими после остеокластов. Размеры этих клеток в зависимости от зрелости варьируют от 50 до 200мкм в диаметре (Harvey J., 2001).

Большие размеры и объем клеток коррелирует с их плоидностью и способностью давать большое количество тромбоцитов. Каждый мегакариоцит способен производить несколько тысяч тромбоцитов. Примерно 4-5 дней требуется для прохождения всех преобразований и продукции тромбоцитов (McGurrin MK et al, 2004) Образование тромбоцитов идет путем регулируемого процесса фрагментации цитоплазмы путем инвагинации плазматической мембраны клетки с образованием систем демаркационных мембран ассоциированных с микротрубочками и актин/моизин комплексом (Sullivan PS et al, 1995; Waner T et al, 2000). Последний играет важную роль в формировании предшественников тромбоцитов (proplatelets) и их разделения от зрелых тромбоцитов (Zimmerman KL. 2000). Регуляция всех этих процессов происходит благодаря таким

интерлейкинам (ИЛ) как ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-12, гранулоцит-моноцит колонистимулирующий фактор (ГМКСФ) и эритропоетин. Однако наиболее важным цитокином регулирующим все этапы созревания мегакариоцитов и образования тромбоцитов является тромбopoетин (ТПО) (Kaushansky K et al, 1995; Gordon MS & Hoffman R 1992). Методом Нортерн блоттинга было показано, что ТПО экспрессируется различными тканями, однако наибольшее его количество обнаружено в печени, затем в почках и гладкой мускулатуре (Bartley TD et al, 1994); Lok S et al, 1994; de Sauvage FJ et al, 1994). Основываясь на том, что тромбоциты способны абсорбировать, утилизировать и метаболизировать ТПО из раствора, было заключено, что уровень ТПО в крови прямо зависит от количества тромбоцитов в крови (Kuter DJ & Rosenberg RD 1995; Fielder PJ et al, 1996). Было показано, что у людей с тромбоцитозом наблюдается гиперэкспрессия ТПО, однако его уровень в крови критически низок из-за усиленного захвата и метаболизма со стороны большего, чем в норме количества тромбоцитов. В противоположность этому у людей с тромбоцитопенией наблюдается повышение уровня ТПО в крови из-за неспособности тромбоцитов абсорбировать этот гормон. Было показано (McCarty JM et al, 1995; Guerriero A et al, 1997; Sungaran R et al, 1997; Hirayama Y et al, 1998), что стромальные клетки костного мозга начинают сами вырабатывать ТПО в ответ на тромбоцитопению. Более того, при ряде воспалительных процессов уровень ТПО выше по сравнению с количеством циркулирующих тромбоцитов (Cerutti A et al, 1997; Tacke F et al, 2002). Это объясняется индуцированием синтез ТПО со стороны ИЛ-6 в ходе воспаления (Wolber E 2000; Kaser A et al, 2001; Wolber E et al, 2001). Ряд экспериментов (Naheed B. et al, 1995) показали, что ТПО без других факторов является полноценным индуктором созревания мегакариоцитов, увеличивает размер и плоидность этих клеток, способствует синтезу росток-специических гликопротеинов (Zeigler F et al, 1994). Более того, ТПО так же способствует образованию колониформирующих единиц из прогениторных клеток, этот процесс останавливается при отмене ТПО (Kaushansky K et al, 1995), а в синергизме с ИЛ-6 или ИЛ-3 образование колониформирующих единиц увеличивается. Интерес представляет и тот факт, что в ходе эксперимента в отличие от ИЛ-6, ИЛ-11 проявляет антагонистические свойства по отношению к эффекту ТПО на образование колонеформирующих единиц.

## 1.7 ПАТОЛОГИИ МЕГАКАРИОЦИТОВ

Патология мегакариоцитов, как важнейший фактор нарушения синтеза тромбоцитов, еще не до конца изучена, однако некоторые работы указывают на то, что при определенных заболеваниях именно поражение этих клеток является основой патогенеза системы свертывания крови.

Известно, что вирус гепатита С (HCV) поражая клетки печени приводит к нарушению синтеза ТПО и, следовательно, действует на процесс образования тромбоцитов из мегакариоцитов в костном мозге (Weksler В. 2007). В работах по исследованию воздействия вирусов на мегакариоциты и образования из них тромбоцитов было показано, что некоторые вирусы, как ВИЧ-1, гепатит С и цитомегаловирус, способны размножаться в мегакариоцитах, и что заболевания вызываемые этим вирусом связаны с тромбоцитопенией и другими тромботическими нарушениями (Chelucci С et al, , 1998; Li X et al, , 1999; Crapnell K et al, 2000). Среди патогенов геморрагических заболеваний, вирус денге ингибирует развитие прогениторных клеток тромбоцитов в костном мозге, тем самым снижая их количество в циркулирующей крови. В экспериментах *in vitro* ранние бласты и гематопозитические клетки в середине пролиферации были инфицированы, затем убиты и удалены дендритными клетками фагоцитозом (La Russa F & Innis В 1995). При инфекции ханта вирусом так же заражаются мегакариоциты, но в отличие от патологии вируса денге нарушений в пролиферации не наблюдается, однако на поверхности этих клеток начинает экспрессироваться HLA, тем самым делая эти клетки мишенью для клеток иммунной системы и, как следствие, развивается тромбоцитопения (Lutteke N et al, 2010).

## 1.8 ПАТОЛОГИЯ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

Согласно данным литературы одним из ключевых поражений для организма свиней, зараженных вирусом АЧС, является поражение системы свертывания крови. Практически во всех случаях заражения, лихорадка сопровождается тромбоцитопенией, усиленным тромбообразованием, активацией как свертывающей, так и антисвертывающей систем. Предполагаемые причины тромбоцитопении либо ухудшение тромбоцитопоза, либо периферическое потребление тромбоцитов в образовании тромбов (С. J. Villeda et al, 1993).

Для подтверждения этих гипотез был проведен ряд исследований. Исследования изменений клеток системы свертывания в костном мозге в динамике АЧС вызванным штаммом E75 выявили, что 25-30% мегакариоцитов подвергаются некрозу на 6 день болезни, далее на 12 день наблюдалась одновременная гиперплазия мегакариоцитов и значительное количество клеток подверглось некрозу. По мнению авторов, эти данные совпадают с развивающейся тромбоцитопенией и могут служить основной причиной этого явления (Rodriguez F et al, 1996a). Таким образом, повреждение и/или уничтожение прекурсоров тромбоцитов может играть важную роль в генезисе тромбоцитопении. Однако необходимо отметить, что заражение периферийных тромбоцитов данные авторы не наблюдали, объясняя тем, что инфицированные мегакариоциты разрушаются в костном мозге и не созревают до тромбоцитов.

В противоположность этому, Perez и др (Perez J et al, 1997) продемонстрировали более низкий процент зараженных мегакариоцитов, как при инфекции с высокой вирулентностью (Малави '83), так и с умеренно вирулентным (DR '78) штаммом АЧС. После заражения с высоковирулентным штаммом, максимальное количество позитивных клеток, 9,5% от общей популяции, было достигнуто на 7 дни, а повреждение клеток было незначительным. После инфицирования умеренно вирулентным штаммом, менее 1% от общего количества мегакариоцитов были инфицированы, но наблюдались серьезные повреждения клеток наряду с уменьшением количества последних. Эти результаты подтвердились и в исследованиях проведенных Эдвардсом и Доддс (Edwards J et al, 1985) которые показали, что всего 2-10% мегакариоцитов были инфицированы в экспериментах с умеренно вирулентным штаммом АЧС. Кроме этого, Эдвардс и др. (Edwards J et al, 1984) в исследованиях относительно функциональных изменений, показали что, несмотря на очевидную тромбоцитопению, тромбоцитопоз был нормальным во время инфекции.

Gomez-Villamandos и др. (Gomez-Villamandos J et al, 1997a) также показали, что ни сосудистые изменения, ни вирусная репликация в различных популяциях клеток костного мозга не привели к нарушению функций костного мозга. Более того, интересным фактом был наблюдаемый повышенный гемопоз. Таким образом, у всех авторов остается неясным вопрос о том, играет ли нарушение и механизм нарушения тромбоцитопоза важную роль в

патогенез тромбоцитопении при АЧС, несмотря на то, что в общем наблюдается поражение костного мозга.

Потребление тромбоцитов на периферии, второй возможный механизм, приводящий к тромбоцитопении, может быть связан с образованием микротромбов в ходе формирования синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) (Rodrigue, F et al, 1996a). Механизм ведущий к образованию этих микротромбов может быть связан с системным высвобождением ферментов, цитокинов, факторов комплемента и продуктов метаболизма арахидоновой кислоты. Эти факторы известны как патогенные механизмы при классической чуме свиней (КЧС) с такой же клинической и патоморфологической картиной (Lange A et al, 2011). Подтверждает это и тот факт, что острая фаза тромбоцитопении совпадает с выраженной виремией и высоким уровнем иммуноглобулинов. Таким образом, образование микротромбов и агрегатов может быть опосредовано влиянием иммунной системы. Помимо изменений в количестве тромбоцитов, при инфицировании животных высоко- и умереновирулентными штаммами АЧС, наблюдается активация и дегрануляция тромбоцитов, а так же изменение морфологических параметров (Gomez-Villamandos J et al, 1996). Так, например, при инфекции вирулентным и маловирулентным штаммами на 3 день заболевания были выявлены ультраструктурные изменения в тромбоцитах. Эти изменения проявлялись образованием псевдоподий, расширением открытой каналикулярной системы, с включениями плотных материалов, истощением альфа-гранул, и все это на фоне увеличения размеров тромбоцитов, местами они были больше клеток крови. Так же наблюдалось скопление органелл в центре клеток. В конце от тромбоцитов оставалась мембрана с плотным материалом по периметру. Агрегации тромбоцитов на различных стадиях были замечены на 5 – 7 день после заражения. Начальный этап агрегации характеризовался кластеризацией клеток и уплотнением мембраны. В местах межклеточного контакта наблюдалась легкая дегрануляция. Далее дегрануляция проявлялась сильнее и в конечном счете происходило слияние мембран и образование бесформенного и в меру плотного агрегата, что совпало также с поражением эндотелия сосудов. Интересно, что у подопытных животных, зараженных подострой формой вируса, агрегации было меньше, а изменение внутриклеточных структур отсутствовало вообще. Зараженные или вирус-положительные тромбоциты, которые могли бы внести свой вклад в распространение вируса, были

обнаружены в заключительной фазе заболевания. У свиней после первой недели инфекции, наблюдается дегрануляция базофильных лейкоцитов покрытых антителами к вирусу АЧС, что приводит к агрегации тромбоцитов и выбросу вазоактивных аминов содействующих отложению иммунного комплекса (Slauson, D & Sanchez-Vizcaino J 1981). Другим важнейшим фактором гемостаза является система коагуляции. В работе Эдвардса и др (Edwards J et al 1984) при инфекции высоковирулентным и маловирулентными штаммами АЧС происходят изменения в системе коагуляции, а именно изменения показателей времени свертывания. Так, инфекция АЧС обеими штаммами приводит к удлинению активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и протромбинового времени (ПВ), начиная с 4 дня. Эти пролонгации усиливаются вплоть до последнего дня заболевания. Время свертывания тромбина (ТВ) удлиняется с 3-го по 4-ый день. Здесь же имеет место тромбоцитопения и увеличение количества VIII-антигена начиная с 3 дня и достигает максимальных значений на 6 – 7 день (Edwards J et al, 1984). Кроме того, Вильеда и др. (Villeda C et al, 1993b) показали, что помимо продления АЧТВ и ПВ, имеет место снижение уровня факторов коагуляции в плазме у животных зараженных высоковирулентным штаммом. Это может быть связано либо с повышенным тромбообразованием (ДВС - коагуляция, ДВС), либо с уменьшением их экспрессии. Последнее менее вероятно, так как в течение заболевания отмечено нормальное функционирование всех ферментов печени. В то время, как АЧТВ является маркером для внутреннего пути коагуляции и влияет на инициацию ДВС синдрома, удлиненное ПВ является индикатором участия в патологии АЧС и внешнего пути свертывания. Последние утверждения указывают на то, что инфекция затрагивает всю систему свертывания крови в целом. В экспериментах с высоковирулентным штаммом Malawi '83 в ходе АЧС наблюдается так же активация фибринолитической системы (Villeda C et al, 1993b). Активация системы свертывания может быть достигнута путем экспрессии тканевого фактора (фактор свертывания крови III) эндотелиальными клетками. Это явление наблюдается, по крайней мере, в *in vivo* опытах при АЧС инфекции (Vallee I et al, 2001) и может быть объяснено выбросом прокоагулянтных мессенджеров, секретируемых инфицированными макрофагами. Другим объяснением может быть нарушение деградации активированных факторов свертывания и нарушение синтеза факторов свертывания в печени. Необходимо

подчеркнуть, что продление времени свертывания, уменьшение уровня фибриногена и уменьшение количества факторов коагуляции на протяжении всей инфекции наряду со снижением уровня пламиногена, являются свидетельством синдрома ДВС (Villeda C et al, 1993b).

## 1.9 СИНДРОМ ДИССИМИНИРОВАННОГО ВНУТРИСОСУДИСТОГО СВЕРТЫВАНИЯ

Согласно ВОЗ синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания это аномальная активация систем свертывания и фибринолиза, приводящая к недостатку тромбоцитов, факторов свертывания крови и фибриногена, так же в крови обнаруживается продукт распада фибрина. (“Activation of the coagulation and fibrinolytic systems, leading to deficiencies of coagulation factors, fibrinogen and platelets. Fibrin degradation products are found in the blood”). (World Health Organization. Blood Transfusion Safety. Geneva. 2002). Обширное образование микротромбов в артериолах и капиллярах называется диссеминированным внутрисосудистым свертыванием (ДВС). Такое состояние обычно наблюдается в патогенезе заболеваний системного характера обычно активирующая систему коагуляции (Calderoni N et al, 1997). Во время ДВС тромбоциты и факторы тромбообразования истощены и вместо этого активируется фибринолитическая система и избыток фибрина не успеваает выводиться должным образом (Cotran R et al, 1990). Вирусные заболевания, являющиеся причиной повреждения эндотелия сосудов могут вызывать ДВС синдром. После некроза субэндотелиальная соединительная ткань служит поверхностью для агрегации тромбоцитов, а некротические клетки высвобождают тромбопластин и другие прокоагулянты (Debbie J et al, 1971; Vick R1988). Подобная патология системы свертывания крови хорошо описана при классической чуме свиней (КЧС).

## 1.10 КЛАССИЧЕСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПАТОЛОГИИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ И АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ.

Классическая чума свиней (КЧС), как и африканская чума свиней (АЧС), высококантагиозное заболевание, но в отличие от АЧС, возбудителем является маленький,

диаметром 40-60-нм (Paton DJ, Greiser-Wilke I. 2003; J. C. Gomez-Villamandos et al 2003; Moennig V, Plagemann PG. 1992), одноцепочечный РНК содержащий, оболочковый икосаэдрический вирус из рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* (Wengler G et al, 1995). Размер примерно 12.3 x 10<sup>3</sup> п.н. (Meyers G et al, 1989; Moormann R et al, 1996). Заболевание поражает членов семейства *Suidae*, в частности домашних и диких свиней (Depner et al, 1995; Blacksell et al., 2006). Первично вирус поражает и размножается в клетках эпителия миндалин (Ressang, 1973a; Ressang, 1973b; Liess, 1987). Дальнейшее распространение по организму за 5-6 дней (Ressang, 1973a). происходит по лимфатическим сосудам и следовательно вторичная репликация происходит в лейкоцитах и моноцитах. Клиника заболевания как любого вирусного геморрагического заболевания характеризуется взаимодействием вируса с основными клетками-мишенями макрофагами (Gómez-Villamandos et al, 2001), эндотелиальными клетками (Heene et al, 1971;), дендритными клетками, лимфотенетическими и эпителиальными клетками (Moennig, 2000). Согласно Gómez-Villamandos (2003) макрофаги играют основную роль в патогенезе КЧС проявляющимся апоптозом, фагоцитической и секреторной активацией, и изменением количества данных клеток в крови. Было показано (Gómez-Villamandos et al, 1998; Summerfield et al, 1998; Gómez-Villamandos et al, 2000; Sato et al, 2000; Sánchez-Cordón et al, 2002), что лимфопения, тромбоцитопения и геморрагия не являются следствием прямого воздействия вируса на соответственные клетки. Считается, что эти процессы опосредованы выбросом медиаторов со стороны активированных макрофагов, а именно выброс фактора некроза опухолей, интерлейкина (ИЛ) 1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, и тромбоцит активирующего фактора (ТАФ). Интересные данные были получены при изучении мегакариоцитарного роста в костном мозге у свиней инфицированных вирусом КЧС.

Между КЧС и АЧС часто проводят параллели, так как оба эти заболевания высококантагиозны и протекают со схожими симптомами и клиникой, а клетками-мишенями в обоих случаях являются клетки моноцитарно макрофагального ряда. При обеих патологиях наблюдается тромбоцитопения, повреждение эндотелия сосудов, геморрагии в органах и тканях, петехии, однако необходимо заметить, что эти заболевания вызываются совершенно разными вирусами (Wengler G 1995). Исследования изменений количества тромбоцитов в динамике КЧС показало, что их число резко снижается в первые 48 часов

после заболевания, что совпадает с проявлением лихорадки, и обостряется в последующие дни (Gomez-Villamandos C et al, 2003). Значительных изменений в количестве предшественников тромбоцитов, мегакариоцитов не обнаружено. Однако выявлены существенные изменения в морфологии этих клеток, связанные с изменением числа различных форм мегакариоцитов (МК). Было показано постепенное снижение количества типичных ядерных мегакариоцитов с 4 дня и появление (cloud-nuclei) облакоядерных мегакариоцитов. Это клетки с вытянутой цитоплазмой и шарообразным ядром локализованным на одном конце цитоплазмы. Они скапливаются в «гнезда» и отличаются от типичных ядерных мегакариоцитов (Gomez-Villamandos C et al, 2003). При исследовании ультраструктурных изменений во всех клетках были обнаружены остатки цитоплазматических гранул и хорошо сформировавшаяся мембрана. Микроклетки и апоптотические клетки также обнаруживались с 4 дни. На 6 дни также были обнаружены апоптотические мегакариоциты, с компактным гиперхроматином в ядре, цитоплазма отсутствовала или же образовывала перинуклеарный ободок. В ходе заболевания было замечено явление эмпериплоеза, т.е в цитоплазме мегакариоцитов обнаруживались морфологически нормальные лейкоциты и нейтрофилы. Этого не наблюдалось в первые дни заболевания, но, начиная с 6-го дня, встречалось часто, а на 8 день стало еще больше и количество поглощенных лейкоцитов тоже увеличилось. Вирус был обнаружен во всех типах мегакариоцитов начиная со 2-го дня. Морфометрические исследования показали, что с 1-го дни идет уменьшение площади клеток и ядра в целом во всех типах мегакариоцитах в процессе заболевания. Однако эти данные перестают быть статистически значимыми с 4дня, а ядерно-цитоплазматическое соотношение повышается (Gomez-Villamandos C et al, 2003).

Обобщая вышесказанное, необходимо заметить, что тромбоцитопения, наблюдаемая в ходе КЧС, не связана с истощением мегакариоцитов в костном мозге. Тем не менее изменения в морфологии этих клеток, такие как увеличение количества микромегакариоцитов, превалирование форм с облакообразным ядром, уменьшение площади ядра и изменения в ядерно-цитоплазматическом соотношении позволяют предположить о дисмегакариоцитопозе, характерном при ВИЧ и миелодиспластическом синдроме (Gibellini D et al, 2013). Причиной нарушения мегакариоцитопоза могут быть такие явления, как инфекция макрофагов и ретикулярных клеток, которые через свои растворимые

химические факторы воздействуют на гемостаз и, в частности, на мегакариоциты. Снижение содержания Т клеток, которые так же регулируют гемостаз, а также нарушение в общем гуморальном балансе может приводить к изменениям в мегакариоцитопоэзе. Более того, авторы утверждают, что количество апоптотических мегакариоцитов очень мало и не может рассматриваться как причина тромбоцитопении, в отличие от АЧС где разрушение клеток предшественников рассматривается как возможная причина тромбоцитопении (Gomez-Villamandos J et al, 1998).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данная работа, за исключением модели острой АЧС, выполнена в лаборатории вирусологии и клеточной биологии Института молекулярной биологии НАН РА.

### 2.1 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Опыты проводились на 24 свиньях породы ландрас, в возрасте от 3-х до 4-х месяцев, весом 25-30 кг, из которых 4 свиньи в контрольной группе и 24 свиней экспериментально зараженных АЧС. Все животные были клинически здоровыми в нулевой точке эксперимента. Животные содержались в отдельных стойлах, где им давали специальный корм два раза в день и доступ к воде в любое время суток.

### 2.2 ВИРУС

Для проведения экспериментов был использован вирус АЧС генотипа II, распространенный на территории республики Армения с 2007 года. Вирус был выделен из селезенки и печени экспериментально зараженных свиней. Для этого от печени и селезенки замороженных при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , отрезался кусочек ткани, который размораживался и далее гомогенизировался в ступке с 30 мл питательной среды ЕМЕМ. Затем гомогенат центрифугировался и надосадочная жидкость, в которой находится вирус АЧС вместе с питательной средой, подавался в матрасы с предварительно засеянными и дифференцированными макрофагами. Данная процедура необходима для размножения вируса и увеличения его количества, поэтому проводилось 40 пассажей в макрофагах, прежде чем определять титр и дозу вируса.

### 2.3 ВЫДЕЛЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В МАКРОФАГИ

Для осаждения эритроцитов из периферической гепаринизированную кровь свиньи смешивают с 6% раствором декстрана в соотношении 1:5. Смесь в пробирке отстаивают 30-40 мин под углом  $45^{\circ}$  в термостате при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  до осаждения эритроцитов.

Плазму, обогащенную лейкоцитами, отбирают, примесь эритроцитов лизируют. Выделенные клетки отмывают центрифугированием в растворе Хенкса при 1000 об/мин в течение 5 мин.

Затем, планшет с 96 лунками засевают лейкоцитами и моноцитами (количество клеток  $3.2 \times 10^4$ / лунка), выделенными из крови здоровой свиньи, для их дифференцировки в макрофаг-подобные клетки. После 48 часов среда с не дифференцированными клетками удаляется и в лунках остаются макрофаг-подобные клетки.

## 2.4 ТИТРАЦИЯ ВИРУСА

Титрация вируса осуществлялась стандартным методом определения гемадсорбирующих единиц, так как было показано, что при наличии инфекции в лейкоцитах, на поверхности последних идет адсорбция красных кровяных клеток с образованием розет (Enjuanes L et al, 1976). Подробнее, в планшет с 96 лунками, в которых находятся макрофаг-подобные клетки добавляется среда (DMEM) с содержанием вируса в различных разведениях, начиная с самого большого разведения к самому меньшему. Через 24 часа инкубации при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\text{CO}_2$ ), в каждую лунку добавлялось 10 мкл среды с эритроцитами свиньи (примерно 80000 клеток) и 40% свиной сыворотки. После 48 часовой инкубации, при наблюдении через световой микроскоп (увеличение  $\times 100$ ) обнаруживалась гемадсорбция. Титр вируса определялся по Reed & Muench (1938), с подсчетом гемадсорбционных розеток в каждой лунке каждого разведения вируса и перерасчете на 1 мл.

Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях определялась в лаборатории до начала эксперимента и составляла  $10^4$  гемадсорбирующих единиц – ГАЕ 50/мл на 1 кг (в  $\text{lg/ml}$ ) массы подопытного животного.

## 2.5 МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

4 свиньи были отделены в качестве контрольной группы и содержались в условиях отсутствия контакта с вирусом. У остальных 24 свиней предварительно провели забор крови для собственного контроля (нулевая точка). Затем всем 20 животным внутримышечно ввели

вирус в предварительно определенной дозе. С 1-го по 7-ой день эксперимента забор крови у инфицированных животных для различных исследований осуществлялся из глазной вены методом описанным ранее (Stier & Leucht, 1980).

## 2.6 ЭФТАНАЗИЯ

Эфтаназия свиней проводилась согласно протоколу Guidefor the Care and Use of laboratory Animals, AVMA Guidelines. Для эффективной эфтаназии использовали ингаляционный метод: свиней помещали в контейнер, содержащий 70-80% CO<sub>2</sub> в течение 15 минут.

## 2.7 ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ КРОВИ И ИХ ОКРАСКА

Для приготовления мазков использовалась свежесобранная периферическая кровь из глазного венозного синуса свиней (Stier & Leucht, 1980) ежедневно в одно и то же время у здоровых и зараженных вирусом АЧС свиней.

Приготовление мазков крови осуществлялось стандартным методом (Houwen, 2002). Подробнее, На сухое и чистое предметное стекло наносят мазок крови следующим образом. На стекло ближе к короткой стороне наносят небольшую каплю крови. Оставляют стекло в горизонтальном положении и размазывают каплю крови по стеклу с помощью чистого шлифованного стекла, помещая его под углом 45°; коротким ребром, подождав, пока вся кровь расплывется по нему. Мазки высушивают на воздухе и маркируют. Высохший мазок должен был равномерно тонким, желтоватого цвета, достаточной величины.

Для морфологического анализа, подсчета количества и размеров тромбоцитов препараты фиксировали в 100% метаноле на 10 минут, затем окрашивали модифицированным раствором Гимза (синий В / лазурный II, эозином и метиленовым синим) в соответствии с протоколом производителя (Номер продукта GS500 Sigma-Aldrich, Германия).

## 2.8 МОРФОМЕТРИЯ ТРОМБОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ТРОМБОЦИТОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ

Препараты крови и отпечатков костного мозга окрашенные по Гимза исследовались с использованием светового микроскопа (Ромейс Б. 1954). Исследование тромбоцитов проводилось согласно описанному методу (Malok et al, 2007). Тромбоциты были подсчитаны при увеличении в 1250 раз, а среднее число тромбоцитов умножали на 20000 для перерасчета на  $\text{мм}^3$ . В каждом препарате исследовалось не менее 75 полей зрения. Мазки крови были обследованы на наличие агрегатов тромбоцитов (увеличение в 1250 раз) для оценки среднего числа агрегатов в поле зрения, а также тромбоцитов в совокупности. Изображение агрегатов тромбоцитов и отдельных тромбоцитов были сделаны с использованием программного обеспечения для анализа изображений (ImageJ, National Institutes of Health, MD, USA). Размеры тромбоцитов были выведены измерениями по меньшей мере  $4 \times 10^3$  клеток в каждом образце в случайной последовательности.

## 2.9 ОКРАСКА ДНК ПО ФЕЛЬГЕНУ И ЦИТОФОТОМЕТРИЯ ДНК

Для цитохимических исследований зафиксированные на предметном стекле препараты отпечатков костного мозга одновременно окрашивали реактивом Шиффа по Фельгену. Гидролиз ДНК проводили в 5N HCl в течение 1 часа при  $t=22^0$  C. Количественное определение комплекса ДНК-фуксин, всех исследуемых форм мегакариоцитов на отпечатках костного мозга в контроле и при воздействии вируса АЧС производили при длине волны 575 нм с визуализацией изображения (увел. 100x1.30), созданном на базе микроскопа-фотометра SMP 05 (ОПТОН, ФРГ), оснащенного компьютером. В каждом случае производили измерения в 100 ядрах. Вычисляли среднее содержание ДНК в ядре (в условно сравнимых единицах), определяли площадь ядер. На основании полученного материала по содержанию ДНК в ядрах строились гистограммы их распределения по классам плоидности. 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  $G_0 / G_1$  клеточного цикла.

## 2.10 ОКРАСКА РНК ГАЛЛОЦИАНИН-ХРОМОВЫМИ КВАСЦАМИ

Для окраски РНК в тромбоцитах галлоцианин-хромовыми квасцами (ГХК) использовали 98% галлоцианин фирмы (Aldrich). Все фиксированные в 96% спирте препараты одновременно окрашивались в течение 48 часов в растворе, приготовленном на основе ГХК. Для количественного анализа содержания РНК использовалась стандартная программа открытого доступа «ImageJ», а содержание РНК было выражено в условных единицах.

## 2.11 ИЗМЕРЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАКТОРОВ КОАГУЛЯЦИИ КРОВИ

Все тесты коагуляции проводили с использованием плазмы, полученной из цитратной крови (3,8% цитрата натрия в качестве антикоагулянта в 9:1 объемном соотношении) центрифугированием при 1500xg, в течение 10 мин. при комнатной температуре. Плазму хранили в аликвотах при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  и оттаивали непосредственно перед каждым экспериментом. Исследования проводились с помощью коагулометра Start 4 (Stago, France).

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Принцип метода АЧТВ состоит в определении времени свертывания декальцинированной плазмы после добавления к ней каолин-кефалин-кальциевой смеси. Эта смесь осуществляет активацию факторов XII, V и VIII гемокоагуляции. Таким образом, АЧТВ оценивает способность формировать фибрин посредством последовательного взаимодействия всех факторов XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I.

**Протромбиновое время (ПВ).** В основе измерения протромбинового времени лежит определение времени формирования фибринового сгустка в исследуемой плазме после добавления к ней тромбопластин-кальциевой смеси. Эта смесь активирует фактор VII и обеспечивает функционирование внешнего каскада формирования фибрина. Так же, как и АЧТВ, исследование проводится с помощью коагулометра Start 4.

**Тромбиновое время (ТВ).** Данный тест отражает взаимодействие тромбина с фибриногеном - конечный этап свертывания крови. При добавлении тромбина к исследуемой плазме измеряется время от момента добавления реагента до образования сгустка.

**D-димеры,** определялись использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора D-Dimer (D2D) ELISA Kit (Product No. ABIN368466). Все тесты проделаны строго согласно указаниям производителя.

**Антитромбин III.** Метод определения активности АТIII основан на способности АТIII нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. Активность АТIII определяют в плазме, добавляя к ней избыток тромбина. При этом происходит ингибирование тромбина комплексом АТIII-гепарин пропорционально количеству АТIII в плазме. Оставшееся количество тромбина катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности АТIII.

**Фибриноген.** Измерение уровня фибриногена проводилось при помощи коммерчески доступного набора Porcine FBG (Fibrinogen) ELISA Kit (E-EL-P0017) от компании Elabscience Biotechnology Co., Ltd. методом твердофазного иммуноферментного анализа, и проводилось согласно указаниям производителя.

**Измерение уровня тромбopoэтина .** Плазма для определения уровня тромбopoэтина у экспериментальных животных, получена из крови без антикоагулянтов центрифугированием при 1500xg, в течение 10 мин. при комнатной температуре. Плазму хранили в аликвотах при температуре -70°C и оттаивали непосредственно перед каждым экспериментом. Измерения проводились с использованием коммерчески доступного набора для определения уровня тромбopoэтина свиней Porcine TPO(Thrombopoietin) ELISA Kit (Catalog No: E-EL-P1759; Elabscience Biotechnology Co.,LTD, WuHan, Hubei Province) методом твердофазного иммуноферментного анализа, и проводилось согласно указаниям производителя.

## 2.12 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА

Все полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки “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 различий между средними значениями определяли по статистическому критерию t-Student. При непараметрическом распределении признаков использовался u-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни с помощью программы SPSS 17.0 (SPSS, INC., Chicago, IL) и статистической программе GRAFPAD 6.0.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Для инициации эксперимента животные заражались внутримышечным (в/м) введением вируса с одинаковой дозой, определяемой гемадсорбционным методом. Для в/м инфицирования характерно раннее выявление вируса в крови и укорочение латентного периода заболевания на 2-4 дня (Guinat C et al, 2014). Течение заболевания в нашем эксперименте не отличалось от хода инфекции в ранее описанных работах, агональная стадия достигалась на 7-8 сутки после инфицирования (Gomez-Villamandos J et al, 1997a).

Первые сутки после заражения протекали практически бессимптомно, несмотря на вирусемию, наблюдаемую с 2-ого дни (до Ig 4-5 ГАЕ/мл). Затем, начиная с 3-4 дни наблюдалась потеря аппетита и гипертермия, а после подъема температуры наружных покровов тела до 40-41<sup>0</sup>С, снижение активности, затруднение дыхания. На 5-6 дни у некоторых животных появилась кровь в фекалиях. Симптоматика нарастала, и на терминальной стадии (начало 7-ых суток) животные умерщвлялись согласно протоколу.

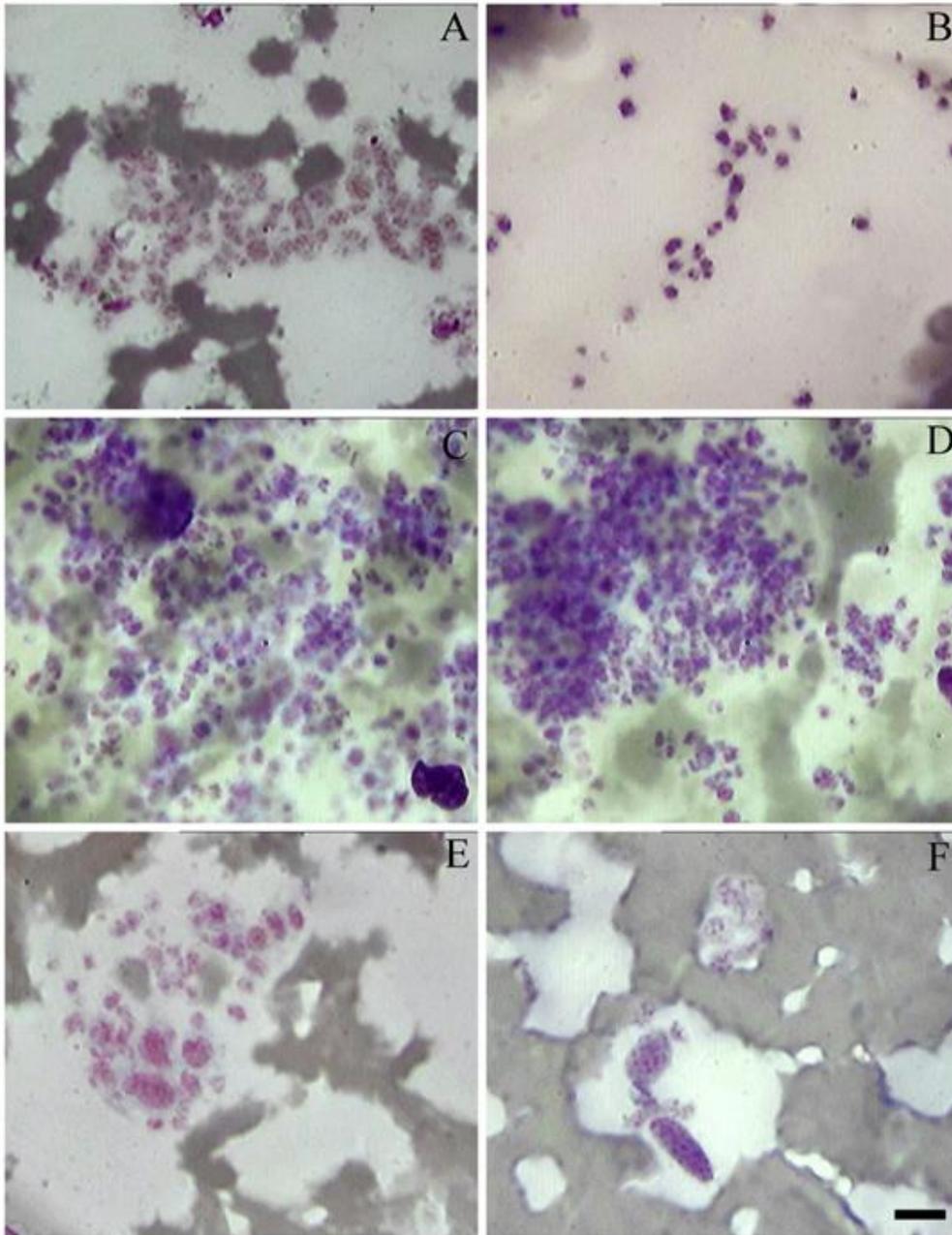
Кожные геморрагии, наблюдаемые на 2-3 день, разных размеров 1-10мм в диаметре, локализованы в основном на внутренней части передних и задних конечностей, на кончиках ушей и были описаны и другими авторами (Anderson E et al, 1987; McVicar J et al, 1981). Описанные ранее (Wilkinson et al, 1980) девиации в поведении животных также наблюдались в нашем эксперименте - животные часто лежали в тени, дыхание учащенное, проявлялась выраженная вялость. Подытожив можно сказать, что клинические проявления заболевания в ходе нашего эксперимента не отличались от описанных ранее в литературе.

### 3.2 ПАТОЛОГИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

Тромбоциты играют главную роль в системе свертывания крови и не только. При различных заболеваниях была показана вовлеченность тромбоцитов в процессы воспаления

и иммунных ответов организма (Karen Y et al, 2012; K. Stokes and D. Granger et al, 2012). Нами так же были изучены изменения количественных и морфометрических показателей тромбоцитов и агрегированных тромбоцитов в динамике АЧС. В динамике заболевания происходит изменение тромбоцитов и агрегации тромбоцитов. Так например по сравнению с контрольными животными (Рисунок 3.1.3. А) у зараженных свиней на 2 дни обнаруживаются тромбоциты размерами меньше нормы (Рисунок. 3.1. В). Вместе с этим на 3 дни у инфицированных свиней были обнаружены большие агрегации тромбоцитов не наблюдаемые у здоровых животных (Рисунок 3.1. С, D). Нами так же обнаружены агрегаты тромбоцитов включающих в себя тромбоциты как очень маленьких так и больших размеров (Рисунок 3.1. Е) а так же гигантские тромбоциты больше напоминающие осколки мегакариоцитов, площадью превышающие размеры эритроцитов (Рисунок 3.1. F)

У здоровых свиней размеры тромбоцитов колеблются от 9 до 11  $\mu\text{m}^2$  в среднем составляя около 300 клеток в  $\text{мм}^3$ . В первый день заболевания (Рисунок 3.3) наблюдается значительное ( $p < 0.05$ ) увеличение количества тромбоцитов с  $298.1 \times 10^3$  клеток в  $\text{мм}^3$  на  $510 \times 10^3$  клеток в  $\text{мм}^3$ . Затем количество клеток снижается и на 3 день достигает  $79.4 \times 10^3$  клеток в  $\text{мм}^3$  ( $p < 0.05$ ). В последний день заболевания количество клеток стало приблизительно в 30 раз меньше контрольных значений и составило  $10.9 \times 10^3$  клеток в  $\text{мм}^3$ . Наряду со снижением количества тромбоцитов в динамике заболевания так же идет изменение размеров тромбоцитов. Так на 1 дни (Рисунок 3.2.) наблюдается уменьшение тромбоцитов с  $11 \text{ мкм}^2$  до  $7 \text{ мкм}^2$  ( $p < 0.05$ ). Данная тенденция сохраняется до 4 дни где размер тромбоцитов достигает минимальных значений и составляют  $4 \text{ мкм}^2$  ( $p < 0.05$ ) примерно в 3 раза меньше контрольных значений. На следующий день размеры тромбоцитов снова увеличиваются и уже составляют  $6 \text{ мкм}^2$  ( $p < 0.05$ ), данная тенденция сохраняется до последнего дни, однако, на последний день заболевания размеры тромбоцитов так и не достигают контрольных значений и составляют  $6.9 \text{ мкм}^2$ , что в 2 раза меньше контрольных показателей.



**Рисунок. 3.1**  
Тромбоциты и агрегированные тромбоциты.

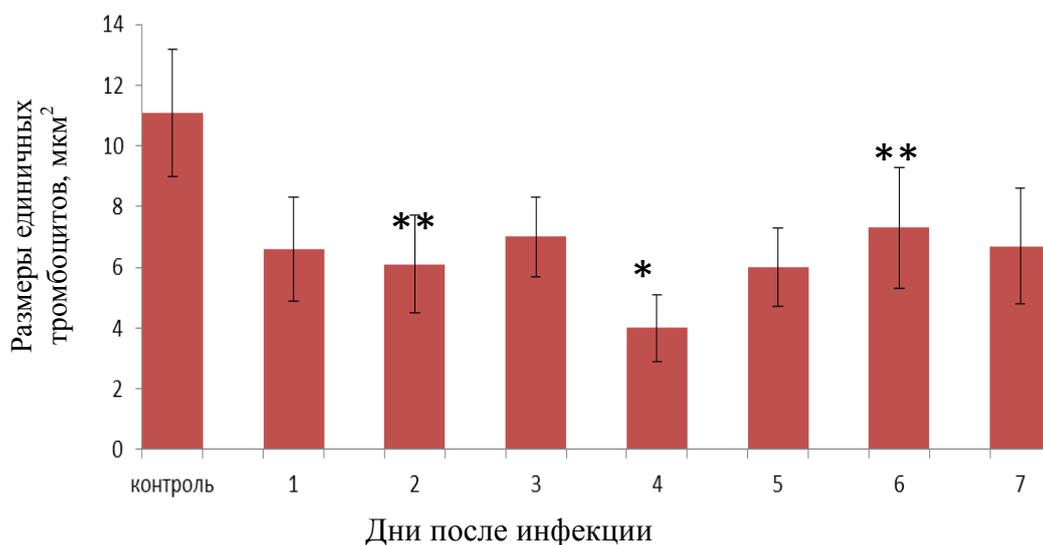
**А.**Контроль.  
Типичная агрегация тромбоцитов.

**В.2** дни.  
Уменьшение размеров тромбоцитов.

**С-Д.3** дни. Большие агрегации тромбоцитов.

**Е.4** дни. Агрегация тромбоцитов различных размеров..

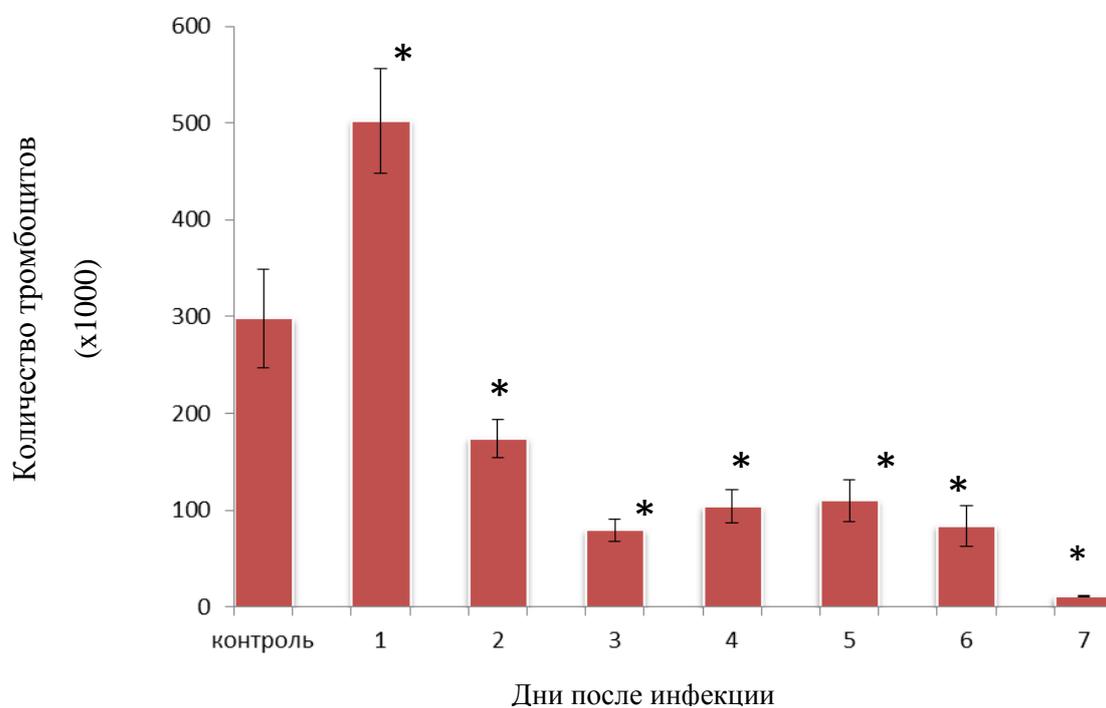
**Ф. 5** дни Гигантские тромбоциты (указаны стрелками).



**Рисунок 3.2.** Размер тромбоцитов в  $\mu\text{m}^2$  в динамике АЧС.

Ось ординат: размеры единичных тромбоцитов в  $\mu\text{m}^2$ . Ось абсцисс: дни после инфекции.

\*-  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.1$  ( $M \pm SD$ )

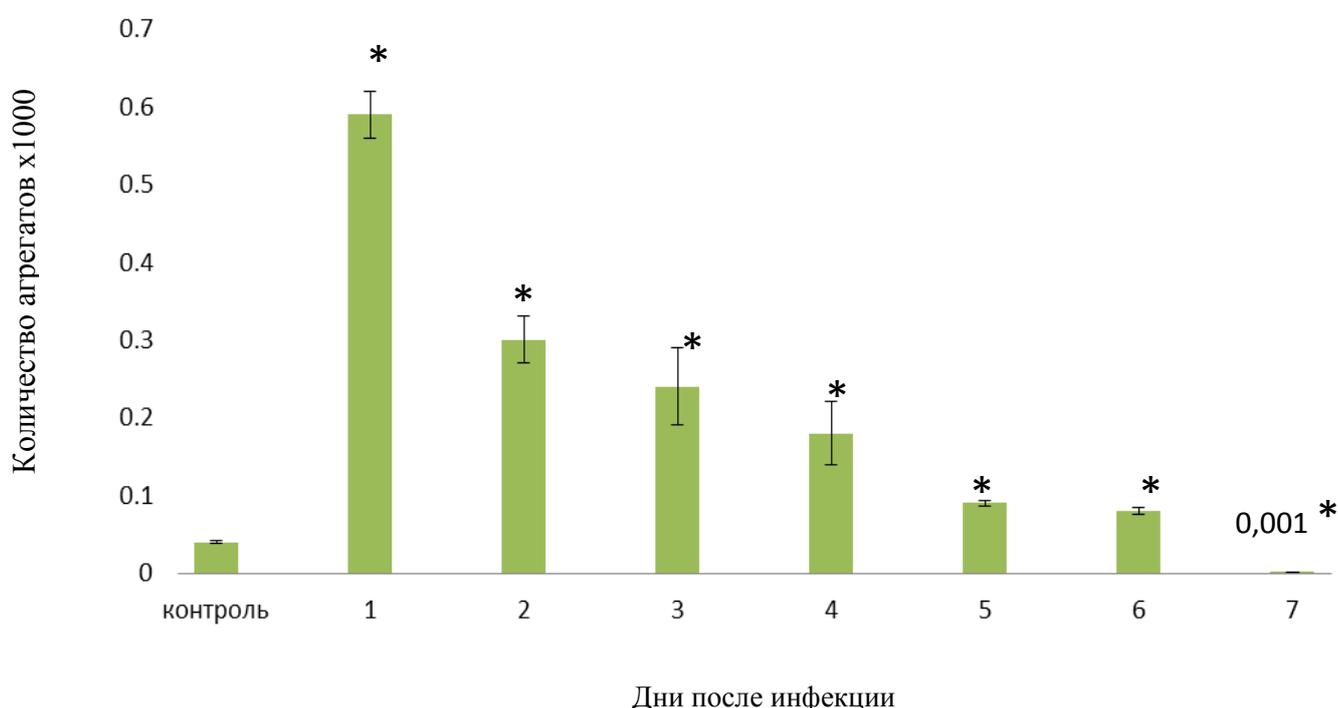


**Рисунок 3.3.** Количество тромбоцитов в поле зрения в динамике АЧС. Перерасчет на  $\text{mm}^3$ .

Ось ординат: количество клеток (x1000) . Ось абсцисс: дни после инфекции. \*-  $p < 0.05$

( $M \pm SD$ )

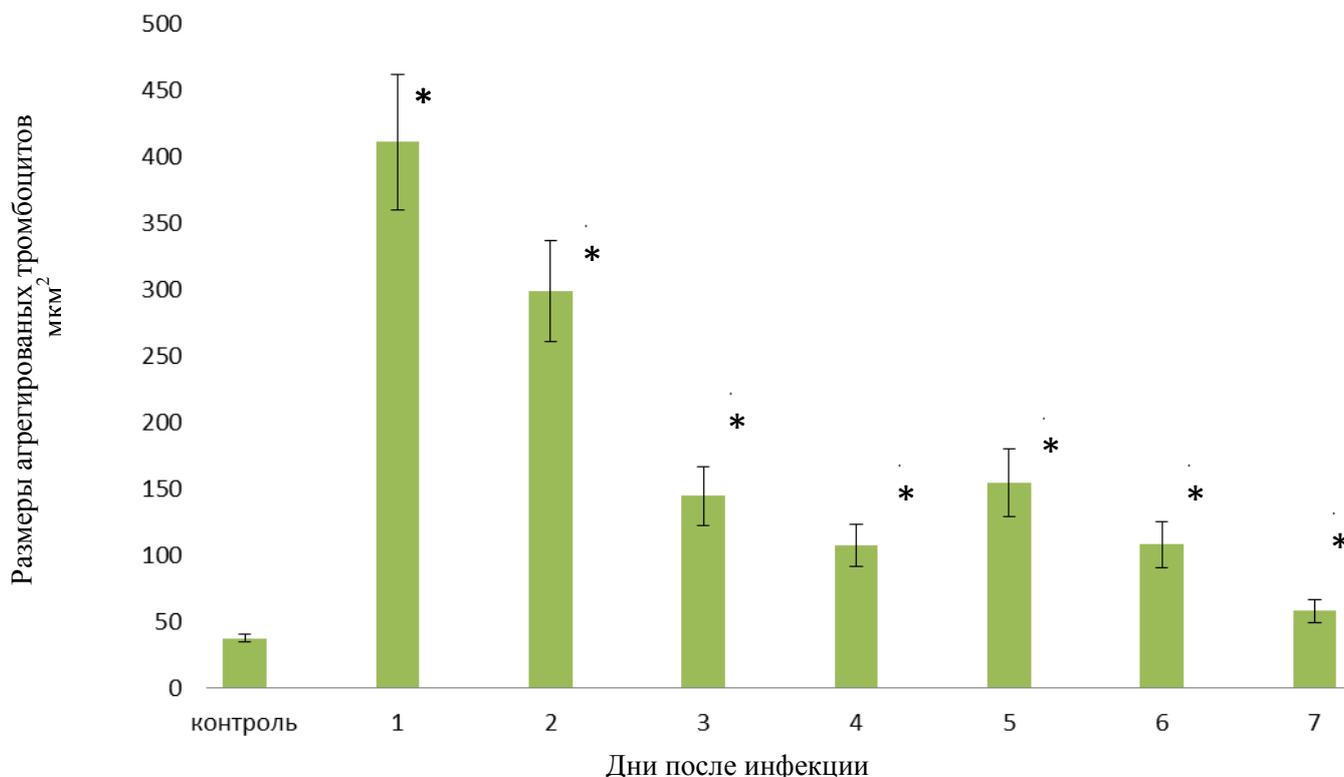
Количество и размеры агрегированных тромбоцитов в динамике заболевания приведены в Рисунке 3.4. и 3.5. Как видно, значительное повышение количества агрегированных тромбоцитов наблюдается с 1-го дня. Однако, в следующие дни количество агрегированных тромбоцитов в поле зрения уменьшалось и достигало минимального значения, в 40 раз меньше ( $p < 0.05$ ) контрольных значений. Интересным образом последние наблюдения совпадают и с размерами агрегатов (рисунок 3.5), которые на 1-ый день почти в 10 раз ( $p < 0.05$ ) больше контрольных значений, однако на протяжении заболевания уменьшаются и в последний день инфекции приближаются к контрольным. Интерес вызывает и тот факт, что количество тромбоцитов в агрегатах незначительно отличается от контрольных значений в динамике заболевания.



**Рисунок 3.4.** Количество агрегированных тромбоцитов в динамике заболевания в поле зрения.

На оси ординат: количество агрегатов.

На оси абсцисс: дни после инфекции. \*-  $p < 0.05$  ( $M \pm SD$ )



**Рисунок 3.5.** Размеры агрегированных тромбоцитов в мкм<sup>2</sup> в динамике АЧС.

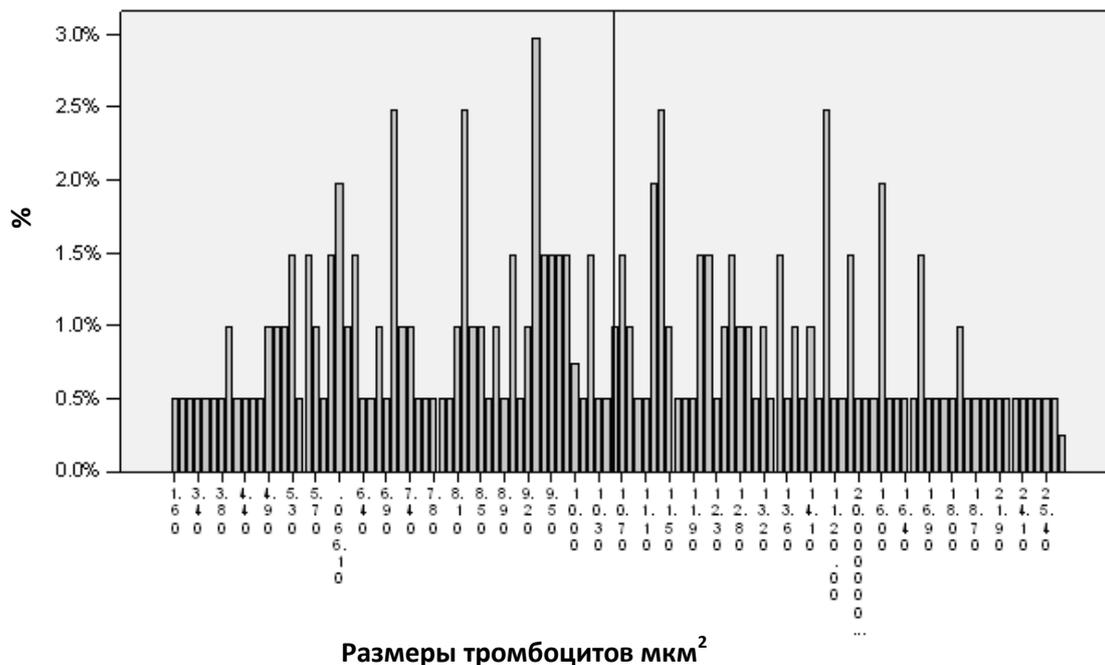
*Ось ординат:* размеры агрегированных тромбоцитов в мкм<sup>2</sup>.

*Ось абсцисс:* дни после инфекции. \*- p<0.05 (M±SD)

В данной главе также представлены данные по характеристике морфометрических показателей тромбоцитов в динамике АЧС. Морфометрические индексы тромбоцитов являются важными индикаторами в выявлении ряда патологических и физиологических состояний у млекопитающих (Gresele P. & Clive P. 2002; van der Loo B et al, 2005). Эти показатели служат основой для дифференциальной диагностики заболеваний свертывающей системы крови со схожей клинической картиной. У здоровых свиней, по данным литературы (Clemmons R et al, 1983), размеры тромбоцитов обычно колеблются от 10 до 12 мкм<sup>2</sup>, Наши данные (Zakaryan H et al, 2014), показывают, что в норме размеры тромбоцитов составляют 11 мкм<sup>2</sup>, а распределение тромбоцитов по площадям дает следующую картину приведенную в Рисунке 3.6.

Как следует из рисунка 3.6. у здоровых свиней распределение вариационного ряда нормальное с медиальным значением размеров тромбоцитов  $11.1 \pm 2.1$  мкм<sup>2</sup>.

Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади у здоровых свиней



**Рисунок 3.6.** Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади у здоровых свиней.

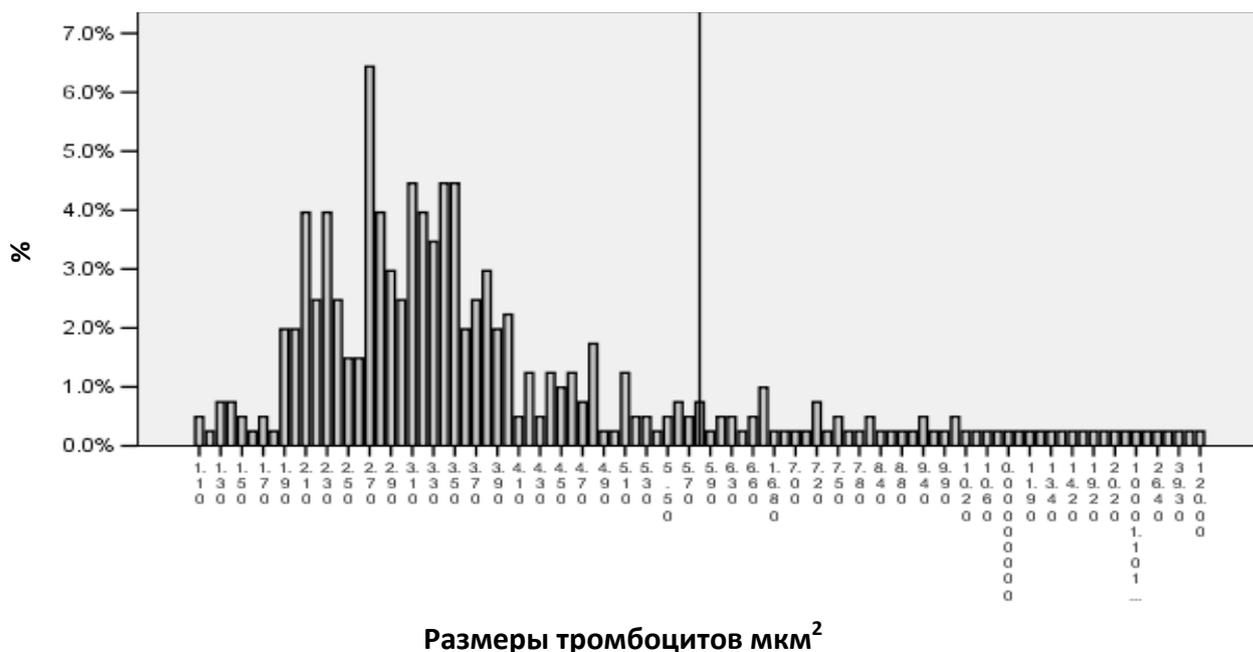
*На оси ординат:* количество тромбоцитов в процентах.

*На оси абсцисс:* размеры клеток в мкм.

С начала заболевания меняется распределение тромбоцитов по площадям, что заметно на 1-ый день (Рисунок 3.7.). Наблюдается отклонение размеров тромбоцитов от нормы, проявляющееся уменьшением площадей тромбоцитов с медиальным значением  $6.6 \pm 1.7 \text{ мкм}^2$ . Здесь же появляются большие тромбоциты с площадью  $120 \text{ мкм}^2$ , но преобладают тромбоциты (2-6%) с размерами меньше медиального значения ( $2.1-4.1 \text{ мкм}^2$ ).

Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади

1-ый день после инфекции



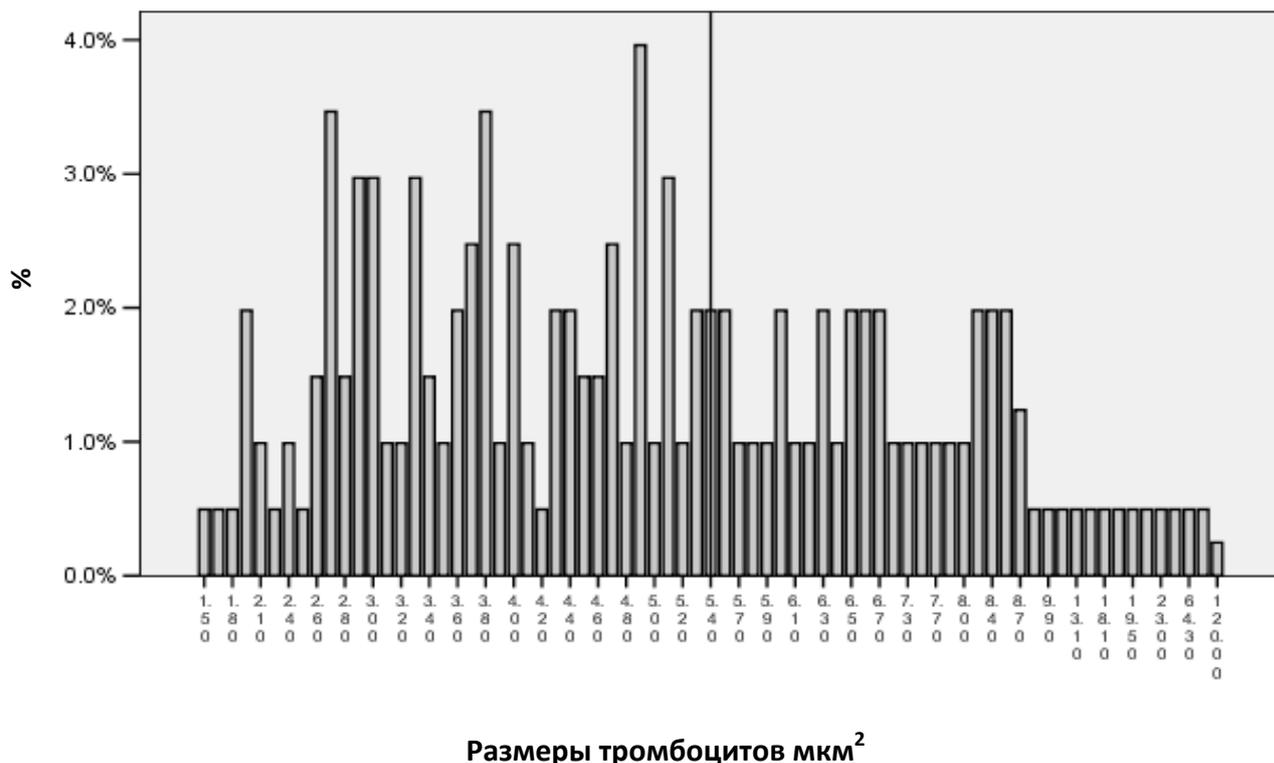
**Рисунок. 3.7.** Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади в 1-ый день после инфекции.

*На оси ординат:* количество тромбоцитов в процентах.

*На оси абсцисс:* размеры клеток в мкм.

На 2-ой день инфекции (Рисунок 3.8.) заметна нормализация распределения тромбоцитов, однако медиальное значение меньше контрольных показателей ( $6.1 \pm 1.6$  мкм<sup>2</sup>), в вариационном ряде преобладают тромбоциты с площадью 4.9 и 5.2 мкм<sup>2</sup>.

Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади  
2-ой день после инфекции



**Рисунок. 3.8.** Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади на 2-ой день после инфекции.

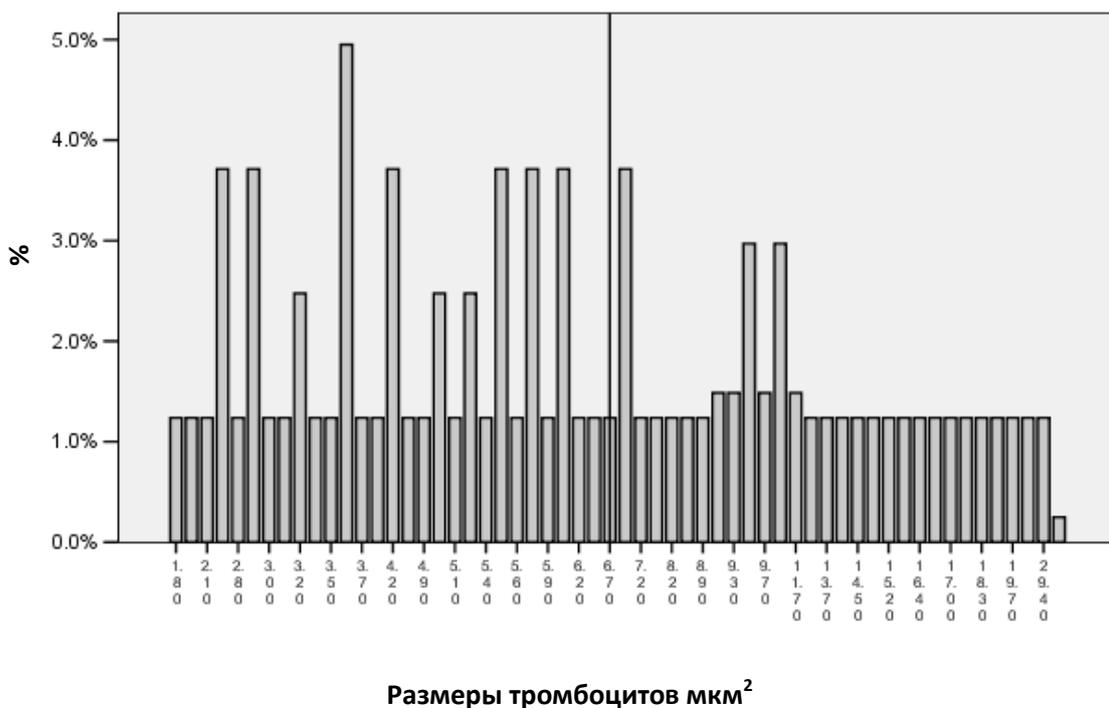
*На оси ординат:* количество тромбоцитов в процентах.

*На оси абсцисс:* размеры клеток в мкм.

3-ий день (Рисунок 3.9.) характеризуется сохранением нормального распределения площадей и медиального значения размеров меньше нормы ( $7.0 \pm 1.3 \text{ мкм}^2$ ) и следовательно увеличение количества тромбоцитов размерами меньше медиального, а именно  $3.6 \text{ мкм}^2$  (5%).

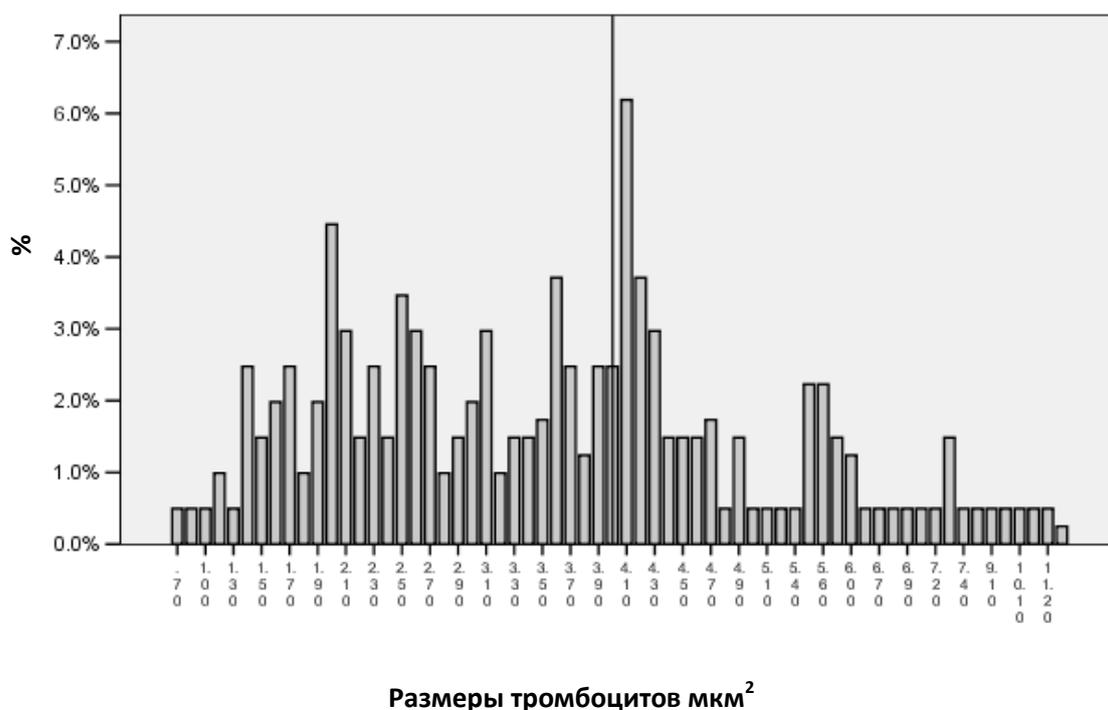
Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади

3-ий день после инфекции



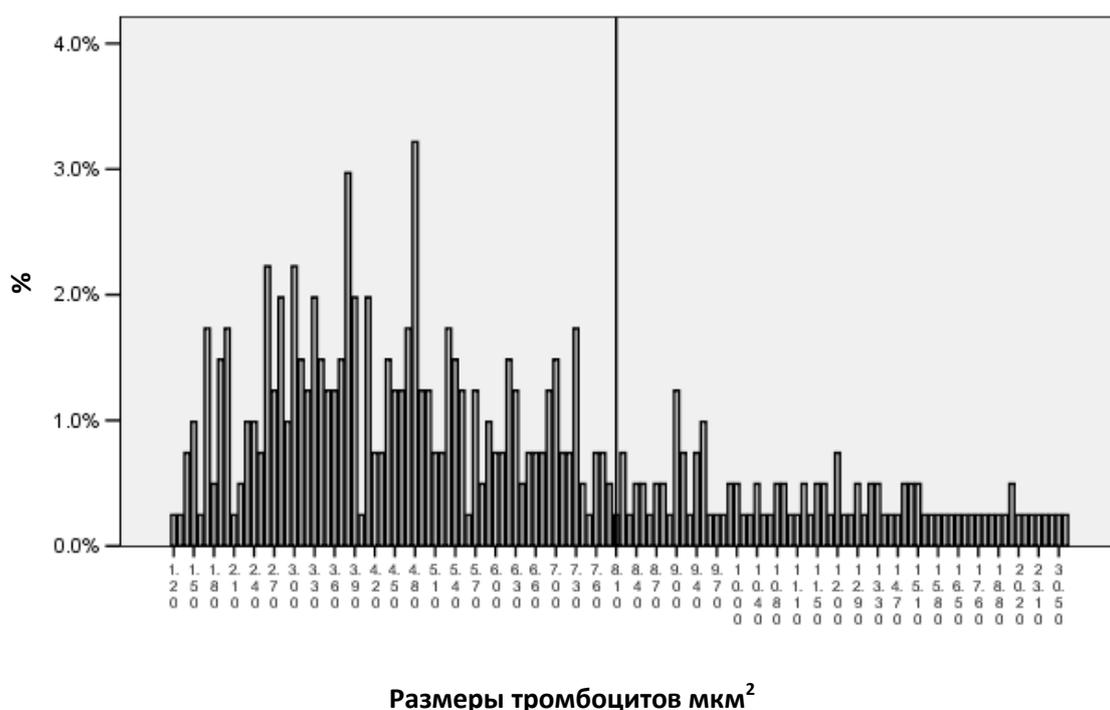
Интересны результаты измерений на 4-ый день (Рисунок 3.10.) где идет снижение медиального значения размеров тромбоцитов  $4.0 \pm 1.1 \text{ мкм}^2$  внутри распределения нормального вариационного ряда. При этом, на 4-ый день преобладают тромбоциты маленьких размеров  $2 \text{ мкм}^2$ , которые не наблюдались в контроле.

Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади  
4-ый день после инфекции



Ситуация меняется на 5 день (Рисунок 3.11), когда распределение вариационного ряда отклонено от нормы с близким по сравнению с 3-им днем медиальным значением размеров тромбоцитов  $6.0 \pm 1.3 \text{ мкм}^2$ . Интерес представляет появление больших клеток достигающих размеров  $30 \text{ мкм}^2$ .

Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади  
5 день после инфекции



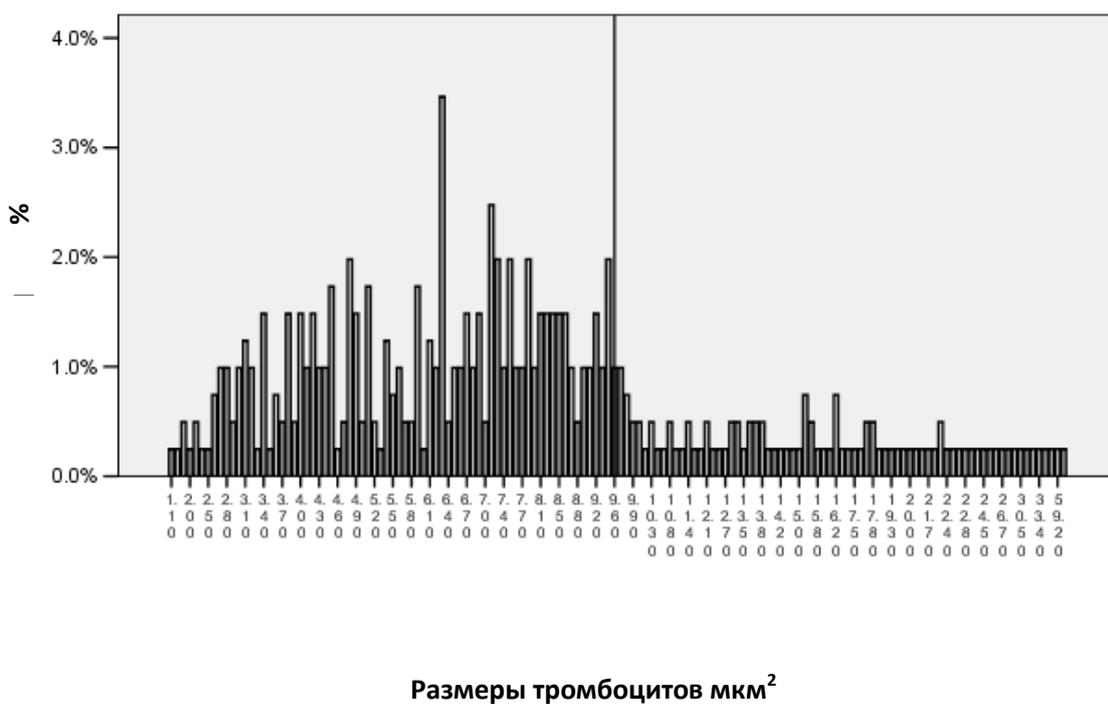
**Рисунок. 3.11.** Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади 5-ый день после инфекции.

*На оси ординат:* количество тромбоцитов в процентах.

*На оси абсцисс:* размеры клеток в  $\text{мкм}$ .

Вслед за выявленными на 5-ый день большими тромбоцитами на 6-ой день (Рисунок 3.12.) появляются гигантские тромбоциты, ненаблюдаемые у контрольных животных, размеры которых достигают  $59.2 \text{ мкм}^2$ . Однако распределение вариационного ряда отклонено от нормы, а медиальное значение размеров ( $7.3 \pm 2.0 \text{ мкм}^2$ ) не сильно отличается от предыдущего дня.

Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади  
6 день после инфекции



**Рисунок 3.12.** Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади на 6-ой день после инфекции.

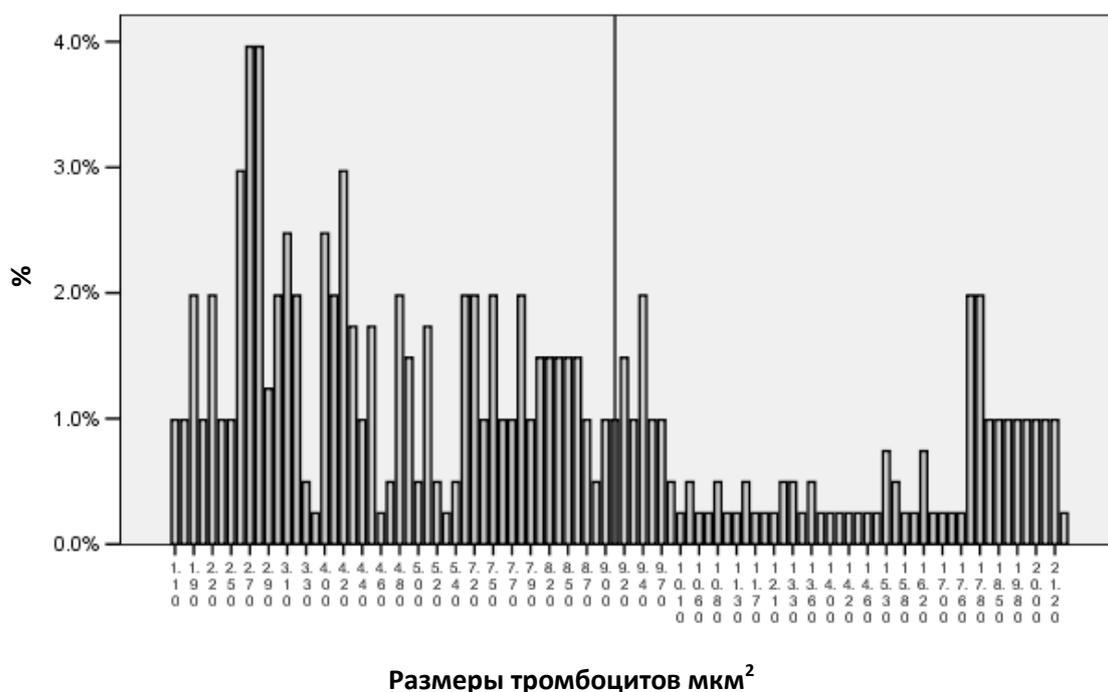
*На оси ординат:* количество тромбоцитов в процентах.

*На оси абсцисс:* размеры клеток в мкм.

7 день, являющийся терминальной стадией заболевания характеризуется ненормальным распределением вариационного ряда с медиальным значением тромбоцитов  $6.7 \pm 1.9 \text{ мкм}^2$ . В вариационном ряде по сравнению с нормой преобладают очень маленькие клетки размерами  $2.6-2.8 \text{ мкм}^2$ , исчезают гигантские клетки наблюдаемые за день до этого, однако, присутствуют большие тромбоциты размерами  $17-21 \text{ мкм}^2$ .

Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади

7 день после инфекции

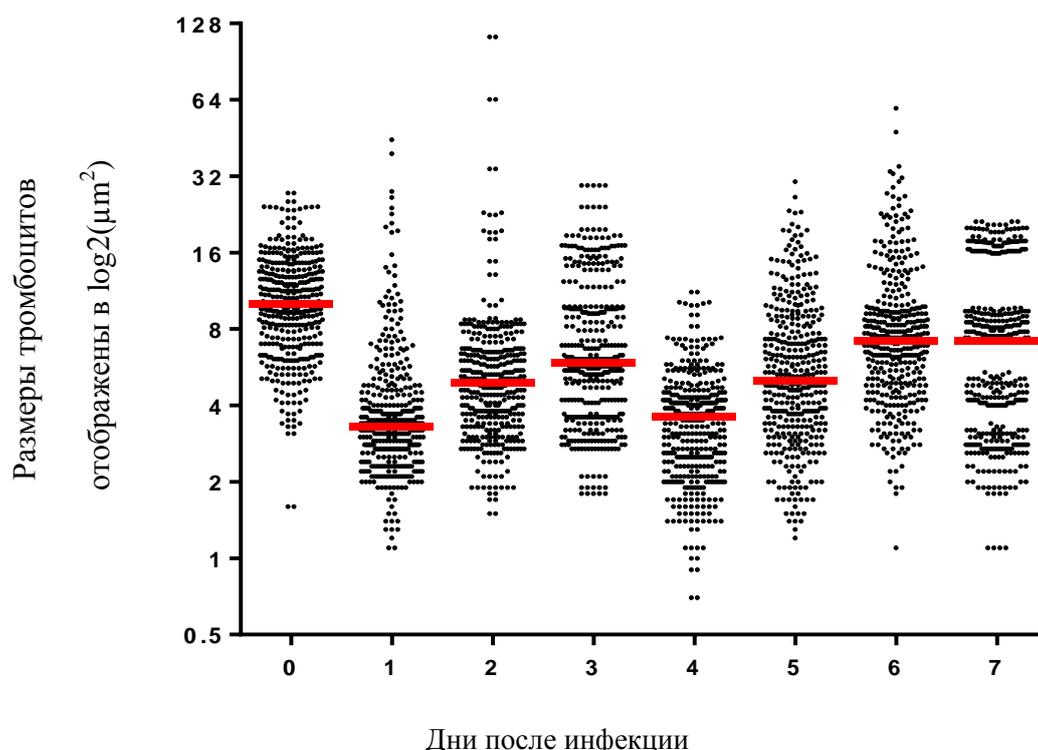


**Рисунок 3.13.** Вариационное распределение тромбоцитов по значению площади 7-ой день после инфекции.

*На оси ординат:* количество тромбоцитов в процентах.

*На оси абсцисс:* размеры клеток в мкм.

Сумарные данные по распределению тромбоцитов по площадям в динамике всего заболевания представлены на Рисунке 3.14



**Рисунок 3.14.** Распределение размеров тромбоцитов в динамике АЧС.

Размеры тромбоцитов отображены в  $\log_2(\mu\text{m}^2)$

В этой главе представлены результаты исследований отображающие морфометрические изменения тромбоцитов в динамике острой формы АЧС.

Данные по корреляции размеров тромбоцитов и их возрастом противоречивы. Некоторые авторы показали, что в норме тромбоциты размерами больше среднего значения являются молодыми клетками в популяции, а тромбоциты размерами больше средних значений являются старыми тромбоцитами (Hirsh J. 1972). Однако, обратное утверждают другие авторы (Craig B et al, 1984) в работе которых показана независимость размеров и возраста клеток. В работе Зейглер и др (Zeigler Z et al, 1978) было показано изменение количества и размеров тромбоцитов при нарушениях различной этиологии в системе коагуляции. При экспериментальной тромбоцитопении вызванной описанными ранее методами (Kraytman M. 1973) было показано, что появление больших тромбоцитов (в 2 раза больше нормы) связано с образованием макромегакариоцитов в костном мозге в ответ на острую тромбоцитопению. Данная гипотеза подтверждается тем фактом, что у

экспериментальных животных время созревания мегакариоцитов укорачивается на 3 дня в ответ на тромбоцитопению. Возможно, в ответ на тромбоцитопению мегакариоциты выбрасывают большее количество фрагментов (компенсаторный механизм), чем в нормальном физиологическом состоянии.

Основываясь на данных приведенных выше, можно предположить что появившиеся с 4-го дня большие и гигантские тромбоциты являются следствием включения компенсаторных механизмов в ответ на тромбоцитопению, наблюдаемую с первого дня заболевания. Более того, картина аналогична и в том, что после исчезновения гигантских тромбоцитов на 6-ой день большие тромбоциты все еще наблюдаются.

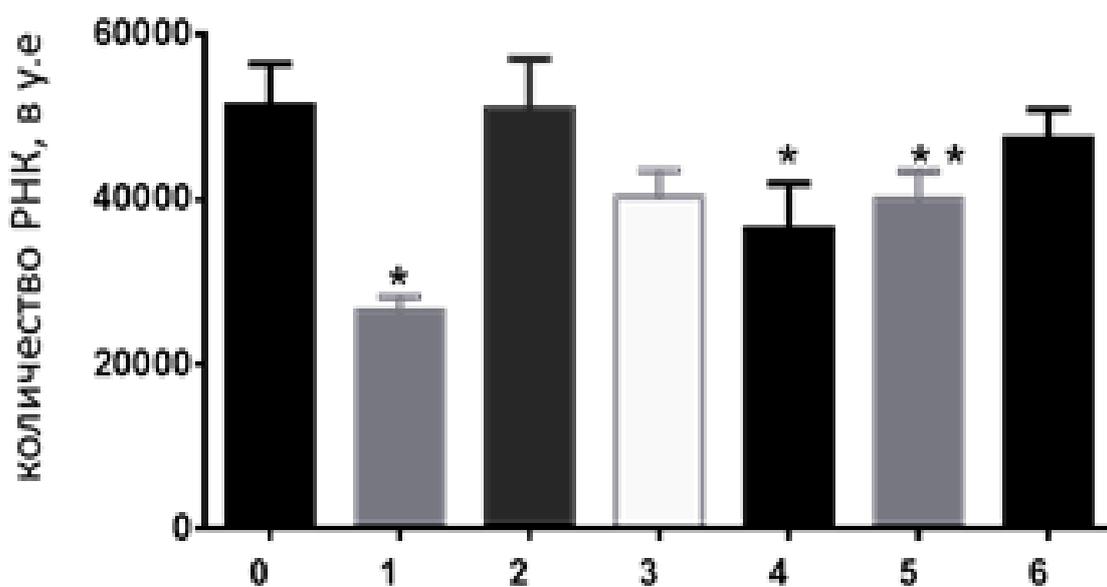
Вопрос об отсутствии больших и гигантских тромбоцитов у контрольной группы животных, и их появление в первые дни заболевания может объясняться способностью агрегировать в зависимости от размеров тромбоцитов, как было показано (Mathios E et al, 2008) тромбоциты больших размеров чаще и больше агрегируют. Учитывая тот факт, что при АЧС вирусемия наблюдается уже через 20 часов после инфекции, и учитывая, что свертывающая система крови участвует также и в иммунных и воспалительных ответах организма в борьбе с вирусом, (Karen Y & Granger D 2012; Huang H & Chang H 2012), можно предположить, что большие и гигантские клетки участвуют в тромбообразовании наблюдаемой со 2-го дни.

Увеличение количества тромбоцитов, размерами меньше нормы, наблюдаемое с первого дня инфекции может свидетельствовать о задержке образования новых тромбоцитов в костном мозге на ранних стадиях заболевания или же утилизация молодых тромбоцитов в образовании микротромбов характерных для АЧС. Появление больших и гигантских тромбоцитов начиная с 4-го дня заболевания может быть связано с нарушениями тромбоцитопоеза в костном мозге из-за наличия вируса в прогениторных клетках: мегакариоцитах. Однако в работах Эдвардс и др ( Edwards J et al, 1985) показано, что вирус в мегакариоцитах обнаруживается на последние дни заболевания (и следовательно не может являться причиной тромбоцитопении.)

### 3.3 ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА РНК ТРОМБОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Как было отмечено ранее количество РНК в тромбоцитах определяет уровень их зрелости и меняется при некоторых заболеваниях (Kienast J. & Schmitz G., 1990).

Нами было исследовано изменение количества РНК в тромбоцитах в динамике заболевания. Как видно из Рисунка 3.15 сразу на 1-ый дни количество РНК достоверно снижается ( $p < 0.05$ ), по сравнению с количеством в контрольной группе.

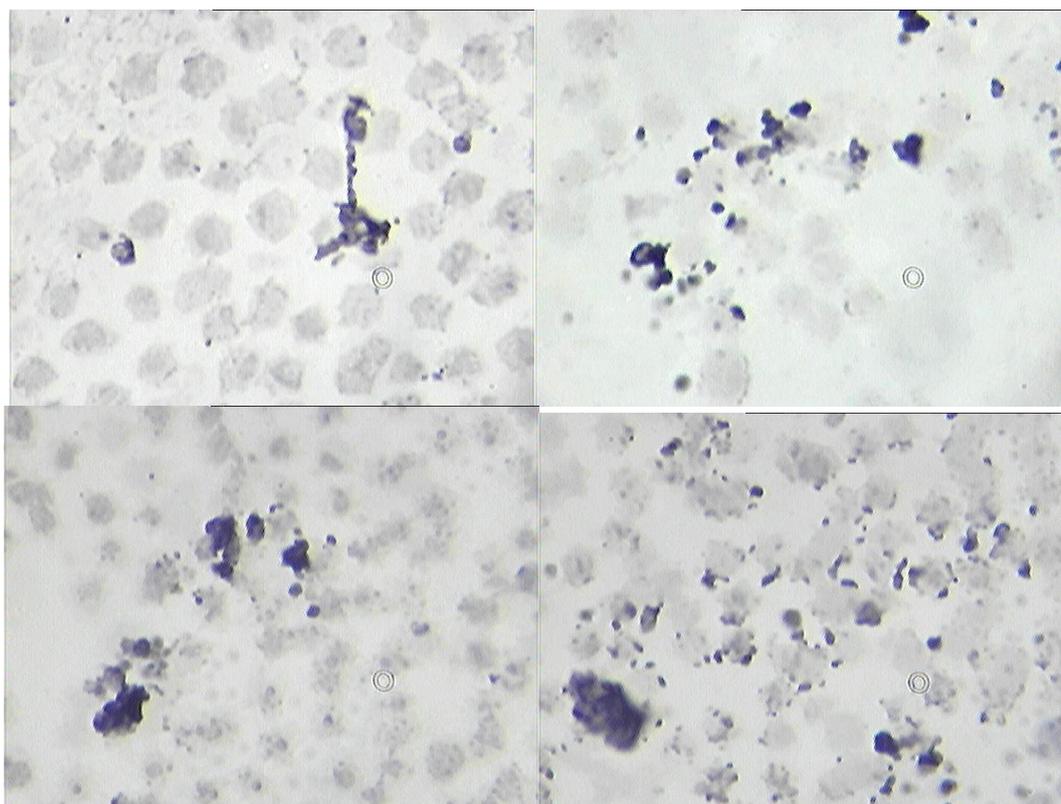


**Рисунок 3.15.** Изменения количества РНК в тромбоцитах в динамике африканской чумы свиней.

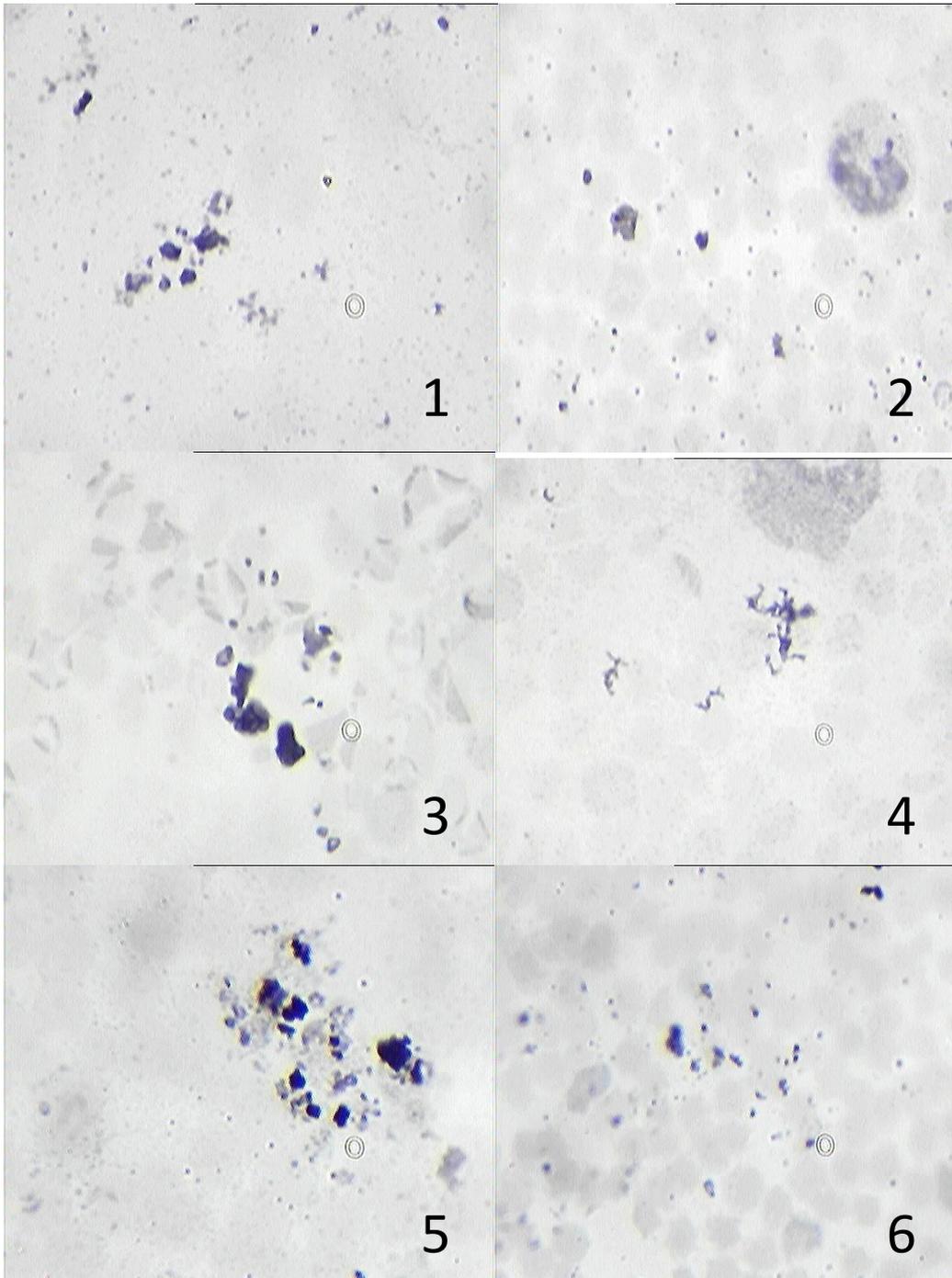
*На оси ординат количество РНК, в у.е.*

*На оси абсцисс дни после инфекции*

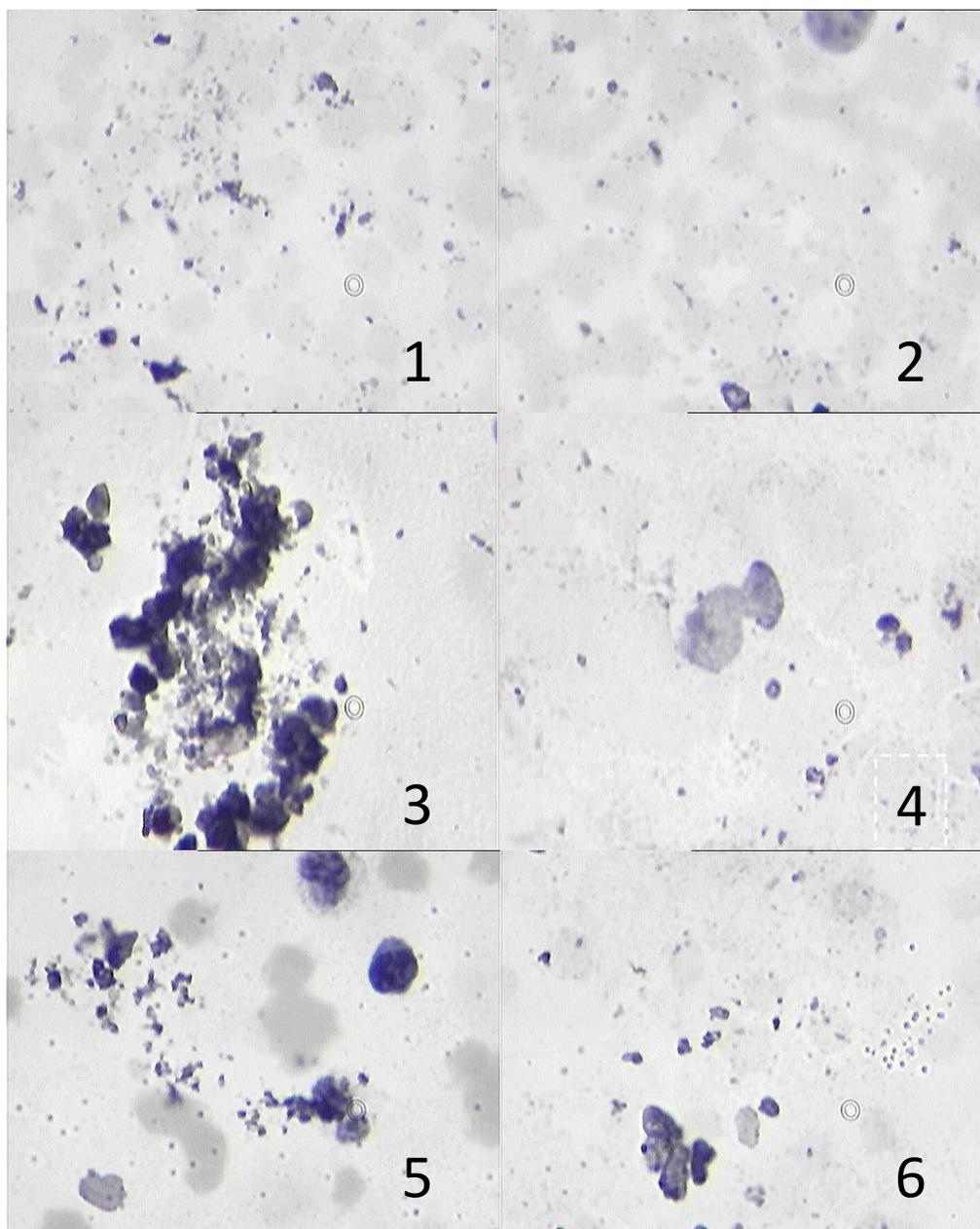
На 2-ой дни количество РНК возрастает, достигая контрольных значений. Начиная со 2-го дни количество РНК возвращается к контрольным значениям. 4-ый дни характеризуется достоверным ( $p < 0.05$ ) снижением количества РНК по сравнению с контролем. На 5 дни количество РНК снижается, однако нами определяется лишь тенденция ( $p < 0.1$ ), по сравнению с контролем. На 6-ой дни количество РНК достоверно увеличилось по сравнению с 5-ым дни и недостоверно по сравнению с контрольными значениями.



**Рисунок 3.16.** Тромбоциты у контрольных животных. Окраска галлоцианин-хромовыми красками на определение РНК.



**Рисунок 3.17.** Тромбоциты при острой форме АЧС в динамике заболевания. Окраска галлоцианин-хромовыми квасцами на определение РНК. 1,2-1dpi. 3,4-2 dpi, 5,6-3dpi.



**Рисунок 3.18.** Тромбоциты при острой форме АЧС в динамике заболевания. Окраска галлоцианин-хромовыми квасцами на определение РНК. 1,2-4дпи. 3,4-5 дпи, 5,6-6дпи.

Данные приведенные выше очень интересны при их сравнении со средними значениями размеров тромбоцитов в динамике заболевания, так как было выявлено совпадение выраженного снижения среднего значения РНК и достоверного снижения среднего значения размеров тромбоцитов на 1-ый дпи. Такое же совпадение уменьшения количества РНК и среднего значения размеров тромбоцитов наблюдается на 4-ый и 5-ый

дпи. Интересно так же и то, что изменение количества РНК на 6-ой дпи и среднее значение размеров тромбоцитов на 6-ой дпи стремятся, но не достигают контрольных значений.

Таким образом, несмотря на отсутствие достоверных изменений, нами выявлены значимые колебания РНК в динамике заболевания острой формы АЧС, что свидетельствует о частичном нарушении функциональной активности тромбоцитов.

С учетом всего вышеизложенного, мы полагаем, что дальнейшие исследования патологии тромбоцитов могут, в будущем, дополнить нашу работу.

### 3.4 ПАТОЛОГИЯ МЕГАКАРИОЦИТОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

В данной главе нами впервые представлены данные об изменениях в популяции прогениторных клеток тромбоцитов, мегакариоцитов в норме и в динамике АЧС. Популяция морфологически определяемых предшественников тромбоцитопоэза в костном мозге здоровых свиней состоит из 4-х типов клеток: мегакариобластов, промегакариоцитов, базофильных и азурофильных мегакариоцитов. Определение типов клеток проводилось морфологическим путем, согласно (Harvey J., 2010). Мегакариобласты являются наиболее ранними морфологически определяемыми клетками тромбоцитопоэза. Размер мегакариобластов в диаметре около 30  $\mu\text{m}$ , ядро в мегакариобластах свиней не исследовались на содержание ДНК, а у человека отличается низкой плоидностью (Tomer A. et al, 1988), с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, однородной структурой ядра и базофильной цитоплазмой без зернистости. Этот тип клеток обычно не выявляется в нормальных аспиратах костного мозга, так как присутствует в небольших количествах и трудно отличается от других бластных клеток. Сравнительно легко дифференцируются следующие в процессе созревания - промегакариоциты. Они имеют несколько ядер и базофильную цитоплазму. Промегакариоцит отличается размерами около 45  $\mu\text{m}$ . Ядро в промегакариоцитах свиней не исследовались на содержание ДНК, а у человека, по данным литературы (Kobayashi Y. & Kondo M., 1999) отличаются полиплоидией, крупным интенсивно окрашенным ядром, иногда зазубренным с тенденцией к полиморфизму. Структура ядра более грубая. Репликации в ядре промегакариоцитов приводит к образованию более крупного базофильного мегакариоцита, чьи ядра объединяются в

лопастные массы. Затем образуется азурофильный мегакариоцит с широкой цитоплазмой или зрелый мегакариоцит. Основными отличиями базофильных и азурофильных мегакариоцитов являются окраска цитоплазмы и ядерно-цитоплазматическое соотношение. Процентное соотношение всех трех типов предшественников тромбоцитов в общей популяции этих клеток у здоровых свиней составляет: 11% промегакариоцитов, 42% базофильных мегакариоцитов, и 47% азурофильных мегакариоцитов (таблица 1) (Акобян А, с соавт, 2015).

Мегакариоциты свиней являются очень крупные клетки костного мозга, и их диаметр может достигать до 80-100 мкм. Ядра в мегакариоцитах свиней не исследовались на содержание ДНК, а у человека, (Tomer A. et al, 1988) отличаются полиплоидией (плоидность 16n и 32n и выше), плотным хроматином и многодольчатой формой. В цитоплазме мегакариоцита, по мере созревания, выявляются скопления азурофильной зернистости, чаще наблюдается отшнуровка пластинок.

Таблица 1

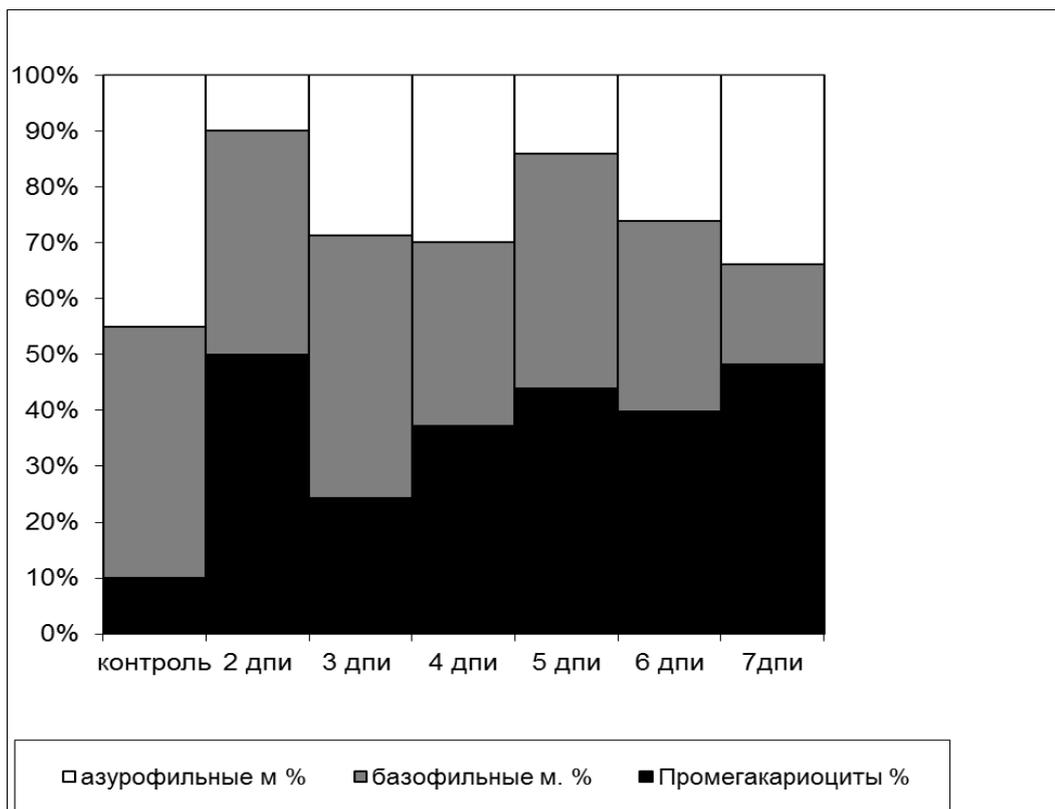
Популяционные и цитометрические характеристики ядерных форм клеток тромбоцитопоэза в костном мозге здоровых свиней.

Клетки	Содержание в популяции (%)	Ядерно-цитоплазматическое соотношение
Промегакариоцит	11.0±2.3	0.60±0.3
Базофильный мегакариоцит	42.0±9.1	0.60±0.1
Азурофильный мегакариоцит	47.0±9.2	0.36±0.1*

\*достоверно ниже по сравнению с базофильными мегакариоцитами (p<0.05)

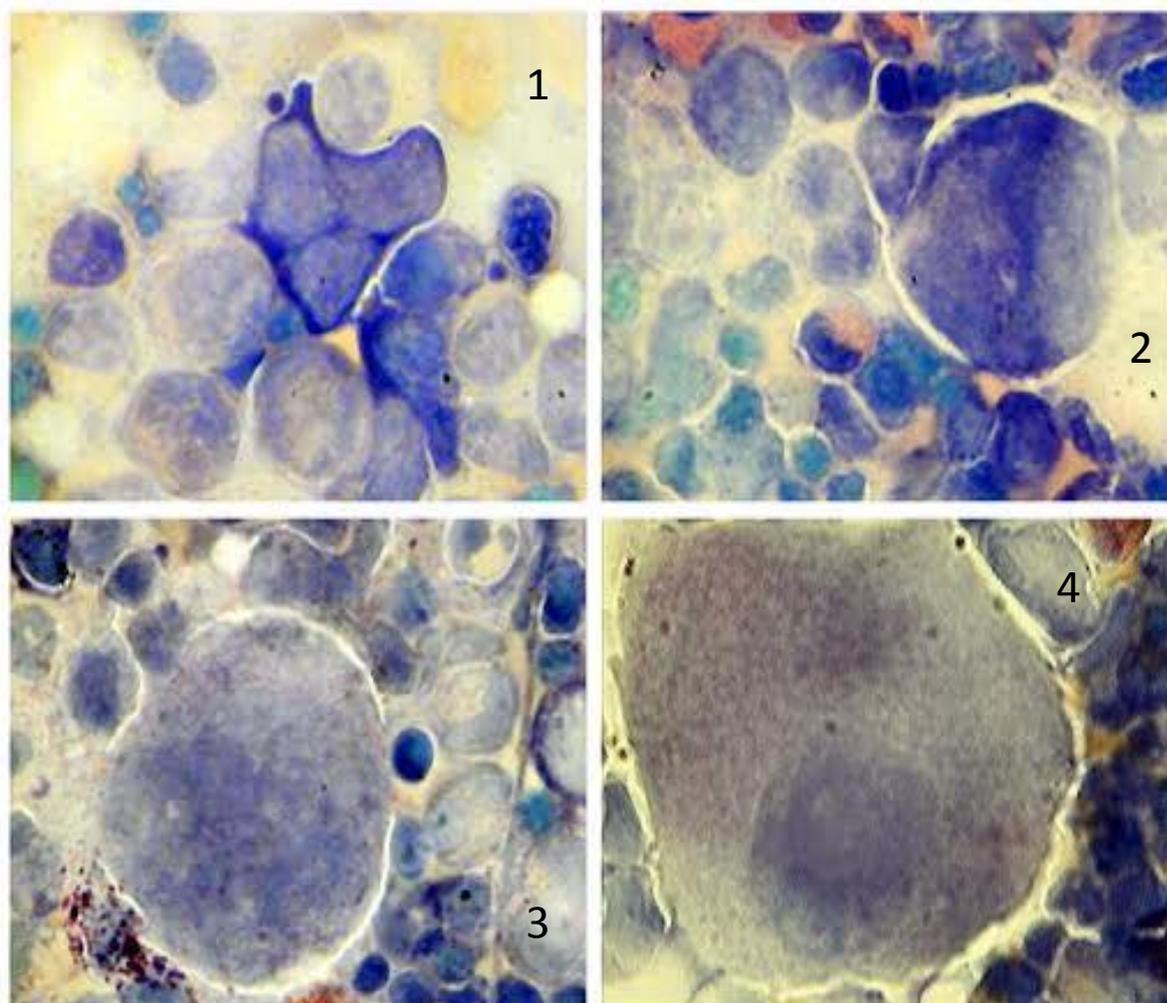
Процентное соотношение всех типов мегакариоцитов резко меняется на 2-ой день, когда количество азурофильных мегакариоцитов снижается почти в 5 раз и составляет всего 10% от всей популяции. В это же время наблюдается противоположная картина у промегакариоцитов, их количество увеличивается в 5 раз и достигает 50% от всей популяции предшественников тромбоцитов. Базофильные мегакариоциты в количестве изменяются незначительно.

3-ий день заболевания характеризуется сокращением количества промегакариоцитов в 2 раза и увеличению количества базофильных и азурофильных клеток по сравнению с предыдущим днем. На 4-ый день количество промегакариоцитов снова повышается и сохраняет тенденцию к повышению до последнего дня заболевания. Изменения в количестве базо- и азурофильных клеток незначительны. 5-ий дни характеризуется сокращением количества прямых предшественников тромбоцитов в 2 раза (14%) по сравнению с предыдущим днем и в 3 раза по сравнению с контролем (совпадает с нашими данными по увеличению количества тромбоцитов в периферической крови на 5 день). Базофильные мегакариоциты приближаются к контрольным значениям. На 6-ой день количество промегакариоцитов и базофильных мегакариоцитов примерно одинаково и не сильно отличается от предыдущего дня, а количество азурофильных клеток увеличилось по сравнению с предыдущим днем, но все еще меньше контрольных значений. Интересно, что на 7 дни количество промегакариоцитов больше контрольных значений примерно в 5 раз как и на 2 дни, однако количество базофильных клеток уменьшилось в 2 раза по сравнению с 2 дни и контролем. Количество азурофильных клеток составило 33,85 % максимальное значение в динамике заболевания. Все описанное выше иллюстрировано на Рисунке 3.19.

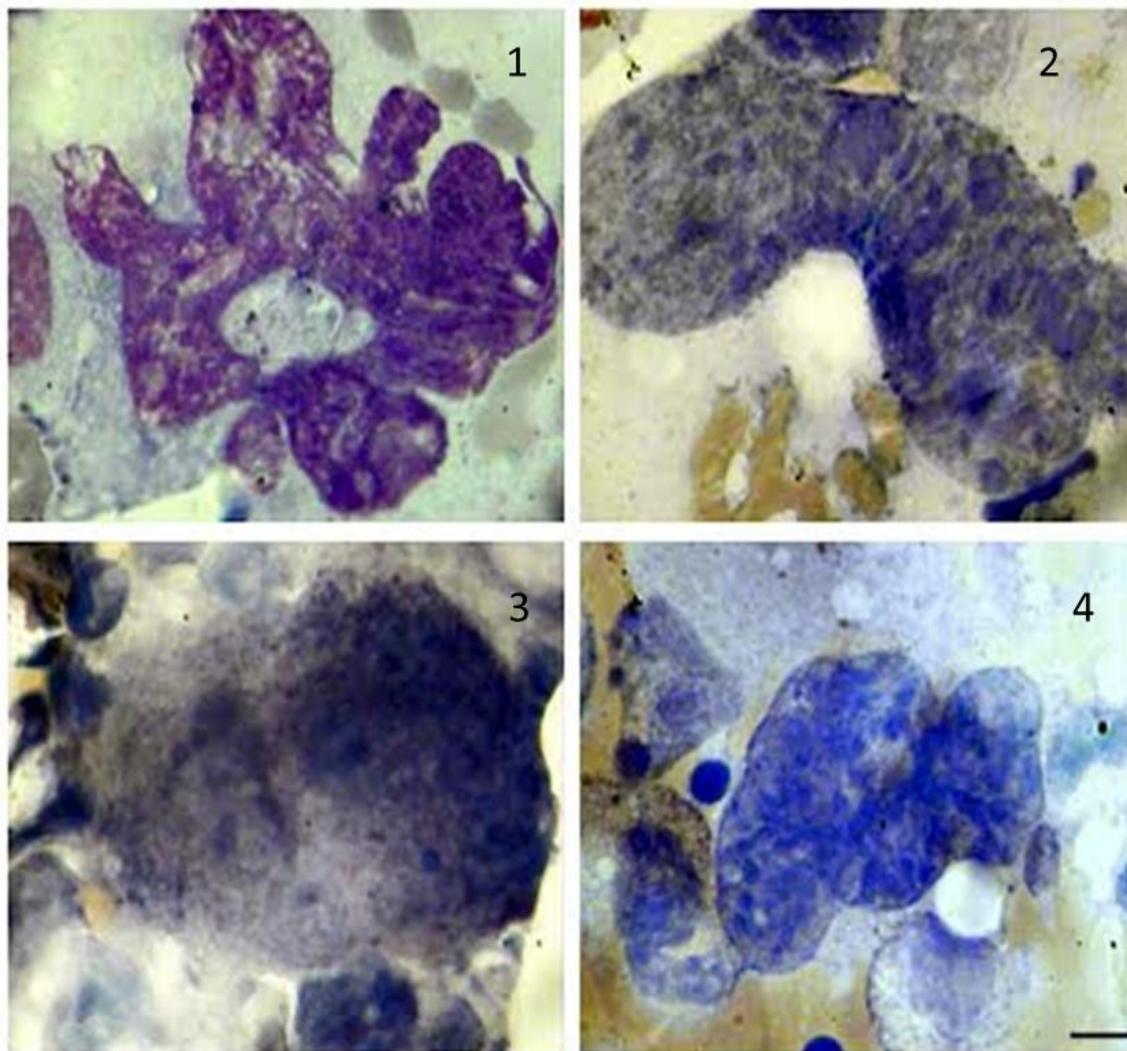


**Рисунок 3.19.** Изменение количества клеток в популяции предшественников тромбоцитов. *На оси ординат:* проценты от общей популяции.

*На оси абсцисс:* день после инфекции



**Рисунок 3.20.** Мегакариоциты здоровых свиней. 1-Промегакариоцит (увеличение x1250). 2,3-Базофильный мегакариоцит (увеличение x500) 4-Азурофильный мегакариоцит (увеличение x312,5).

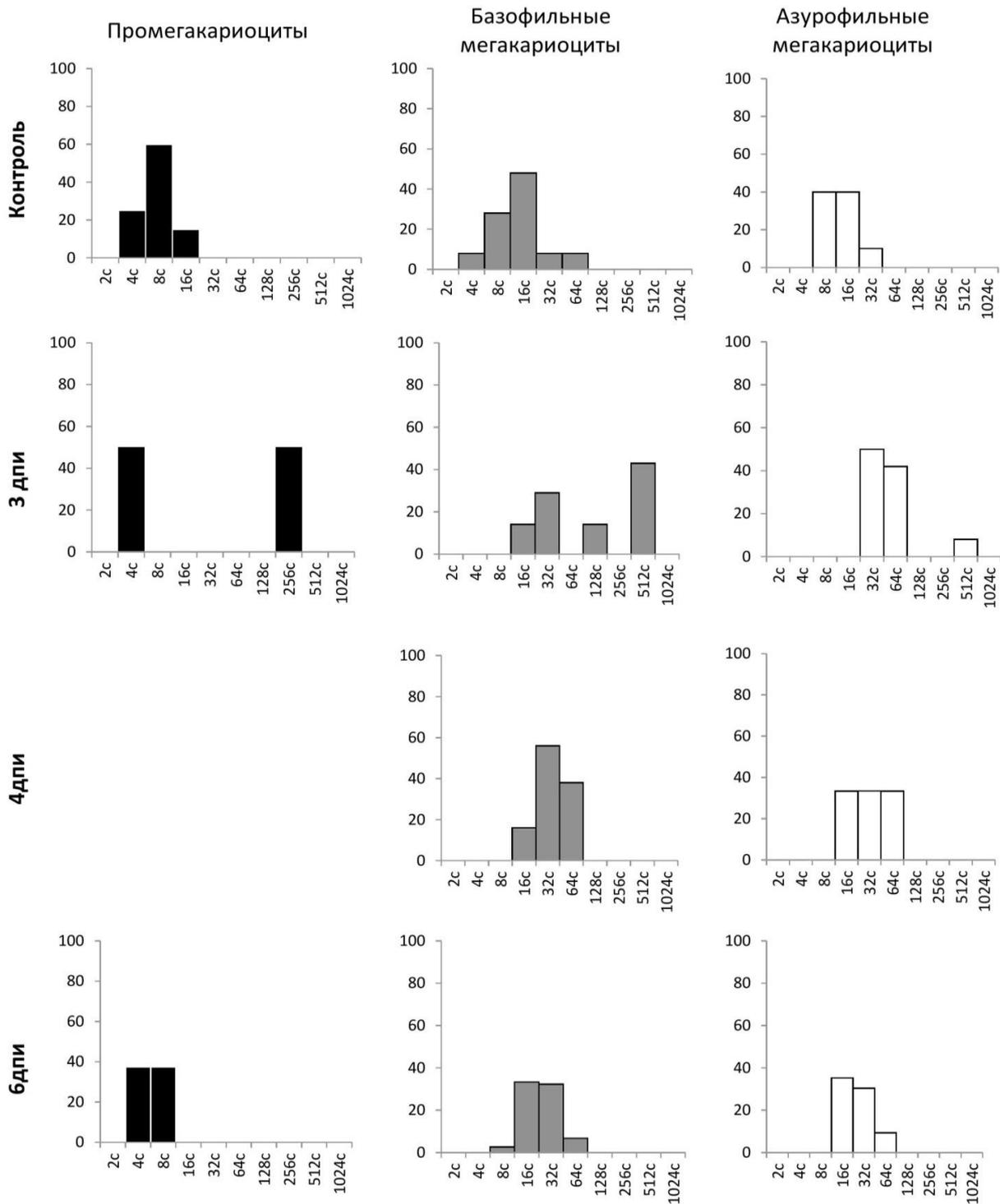


**Рисунок 3.21.** Мегакарициты свиней на 6-ой дни АЧС.

1-Промегакарицит (увеличение  $\times 312,5$ )

2-Базофильный мегакарицит (увеличение  $\times 312,5$ )

3, 4-Азурофильный мегакарицит (увеличение  $\times 312,5$ )



**Рисунок 3.22.** 1ый столбец. Распределение ядер промегакариоцитов по классам плоидности в костном мозге здоровых свиней и свиней зараженных вирусом африканской чумы.

2ой столбец. Распределение ядер базофильных мегакариоцитов по классам плоидности в костном мозге здоровых свиней и свиней зараженных вирусом африканской чумы..

3 столбец. Распределение ядер азурофильных мегакариоцитов по классам плоидности в костном мозге здоровых свиней и свиней зараженных вирусом африканской чумы.

*Ось абсцисс:* содержание ДНК в единицах плоидности; *ось ординат:* частота встречаемости ядер в процентах

Как видно из Рисунка 3.22 у здоровых свиней от общего количества промегакариоцитов примерно 45% составляют клетки с плоидностью 8с, остальное клетки с плоидностью от 4 до 16с. В популяции мегакариоцитов картина иная. У здоровых свиней в популяции базофильных мегакариоцитов наибольшее количество составляют клетки с плоидностью 16с (48%), однако значения плоидности варьируют от 4с до 64с.

При распределении ядер по классам плоидности азурофильных мегакариоцитов было выявлено, что в процентном соотношении равное количество клеток с плоидностью 8с и 16с, и 10% 32с клетки.

В динамике АЧС наблюдается смещение гистограммы всех трех типов клеток. При исследовании плоидности промегакариоцитов на 3-ий дни было выявлено разделение этой популяции на две группы клеток с плоидностью 4с и 256с (иными словами на гиперполиплоидные и тетраплоидные). Последнее не наблюдалось в промегакариоцитах у здоровых свиней и в следующие дни заболевания. В распределении ядер по классам плоидности у базофильных мегакариоцитов на 3-ий день наблюдается сдвиг гистограммы вправо со значениями 16с, 32с, 128с и 512с. Наибольшее количество составляют клетки с плоидностью 512с(45%). В популяции азурофильных мегакариоцитов наоборот на 3-ий день преобладают клетки с плоидностью 32с (50%) и 64с (42%), и всего 8% составляют клетки с плоидностью 512с.

На 4-ый день наблюдается полное отсутствие промегакариоцитов в костном мозге зараженных свиней. Гистограммы распределения ядер базофильных и азурофильных мегакариоцитов сдвинулись влево и представлены клетками с плоидностью 16с, 32с и 64с. Терминальная стадия заболевания (6-ой день) характеризуется сдвигом гистограммы влево. Значения плоидности у промегакариоцитов приближается к контрольным значениям, но не

достигают их. Наибольшее количество составляют клетки с ploидностью 16с (50%), затем 32с (32%), и 64с (18%). Pлоидность базофильных мегакариоцитов на 6-ой день достигает контрольных значений, однако распределение ядер не так разнообразно, наблюдаются клетки только с ploидностью 4с (50%) и 8с (50%). Азурофильные мегакариоциты с ploидностью 16с и 32с преобладают на 6-ой день и в малом количестве наблюдаются клетки с ploидностью 8с (5%) и 64с (10%)

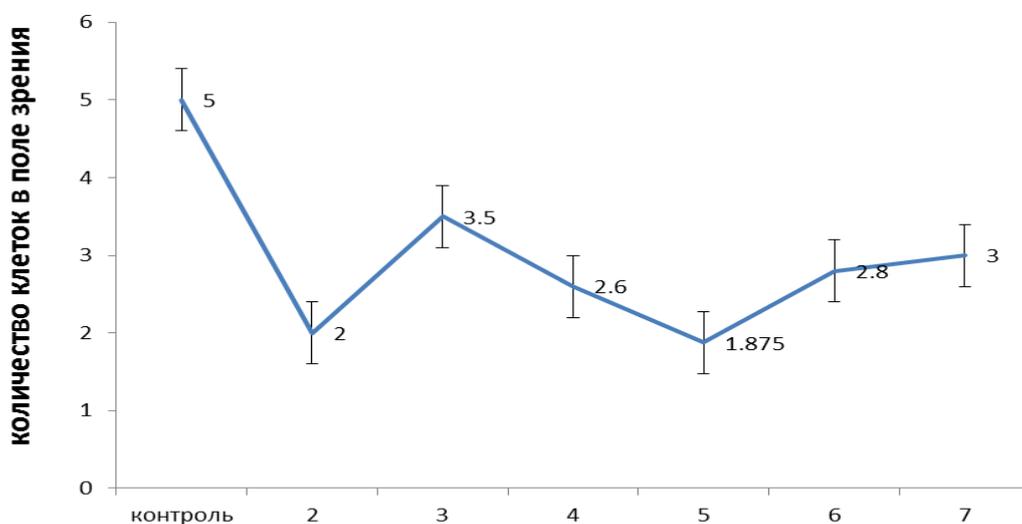
Анализ данных по содержанию ДНК показывает, что во всех популяциях прогениторных клеток тромбоцитов на начальном этапе заболевания АЧС (3-ий день включительно) наблюдается сдвиг гистограммы вправо. У промегакариоцитов сдвиг гистограммы с максимальным значением ploидности наблюдается на 3-ий день (256с), однако сразу на следующий день (4-ый день) отмечено исчезновение клеток данной популяции. В популяциях базофильных и азурофильных мегакариоцитов наблюдается сходная картина сдвига гистограммы. На 3-ий день наблюдается резкий сдвиг гистограммы и достижение максимальных значений ploидности 512с. На следующий день в обеих популяциях наблюдаются клетки с одинаковыми значениями ploидности, и лишь на последний день заболевания, азурофильные мегакариоциты представлены более разнообразными фенотипами, однако в обоих случаях наблюдается тенденция к возвращению к начальным значениям.

Как известно (Levine R et al, 1982) ploидность мегакариоцитов и их зрелость непосредственно связаны друг с другом. Также ранее было показано, что при экспериментальных тромбоцитопениях идет акселерация этапов созревания мегакариоцитов и увеличение ploидности клеток. Наши данные по изменению ploидности предшественников тромбоцитов совпадают с изменениями количества и размеров тромбоцитов в периферической крови в динамике АЧС.

Обобщая полученные данные можно сказать, что в ходе инфекции у промегакариоцитов происходит сдвиг гистограммы распределения ядер по ploидности вправо начиная с 3-го дня, однако в последний день заболевания отмечается возвращение гистограммы к контрольным значениям. У базофильных мегакариоцитов по сравнению с промегакариоцитами и контрольными значениями наблюдается более выраженный сдвиг гистограммы вправо, однако с 4-го дня гистограмма начинает сдвигаться влево. В последний

день заболевания плоидность клеток меньше, чем в контроле. Азурофильные мегакариоциты также показывают смещение гистограммы вправо, а на 6-ой дни гистограмма соответствует контрольным значениям. Выше описанное позволяет предположить, что скорее всего данные изменения носят компенсаторный характер и направлены на усиленную пролиферацию мегакариоцитов для восполнения количества тромбоцитов в периферической крови.

Нами также исследовано изменение количества общей популяции клеток предшественников тромбоцитов в динамике заболевания. Как видно из Рисунка 3.23 по сравнению с контрольными значениями на протяжении заболевания встречаемость мегакариоцитов снижается (тенденция) на 1-ый дни в среднем до 2-х клеток, затем возрастает на 3дпи и снова снижается достигая минимальных значений на 4-ый дни составляя около 1.875 клеток. Затем количество клеток начинает расти, однако не достигает контрольных значений.

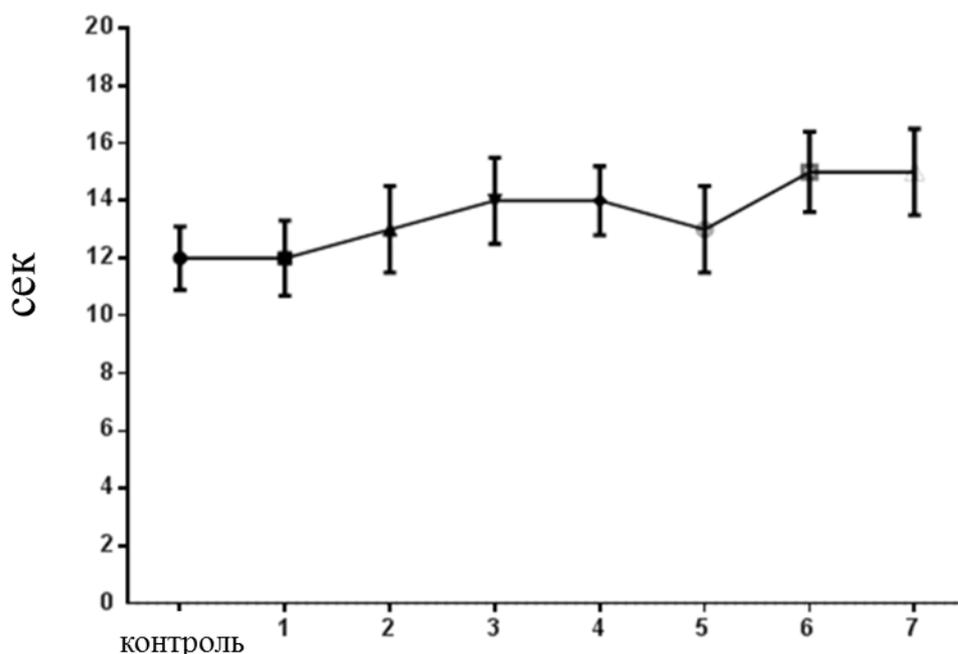


**Рисунок 3.23** Изменение количества общей популяции клеток предшественников тромбоцитов в костном мозге в динамике заболевания в поле зрения.

*Ось ординат: количество клеток в поле зрения; ось абсцисс: дни после инфекции*

### 3.5 НАРУШЕНИЕ ГЕМОСТАЗА В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Факторы коагуляции играют важную роль не только в гемостазе, но и тромбогенезе. Коагуляция является совокупностью протеолитических реакций факторов свертывания. Отличают внешний путь коагуляции, зависящий от тканевого фактора, и инициирующий реакции свертывания и внутренний путь свертывания крови, который, амплифицирует реакции каскада свертывания приводящие к агрегации тромбоцитов. Повышение уровня факторов коагуляции повышает риск тромбообразования (Rinsho N et al, 2014). В динамике АЧС факторы свертывания крови были изучены несколькими авторами (Edwards J et al, 1984; Blome S et al, 2013). Изменение показателей факторов свертывания крови в динамике острой формы АЧС вызванной 2-ым генотипом изучены нами впервые.

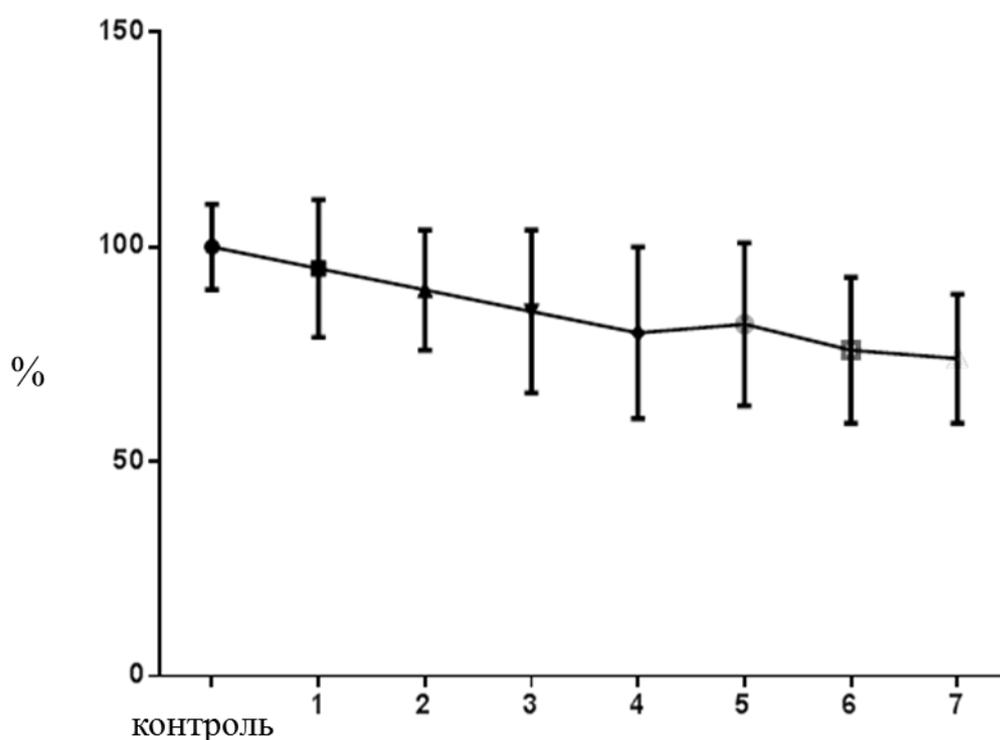


**Рисунок 3.24.** Изменение протромбинового времени (ПВ) в динамике заболевания.

*На оси абсцисс дни после инфекции. На оси ординат время в секундах (сек). (M±SD)*

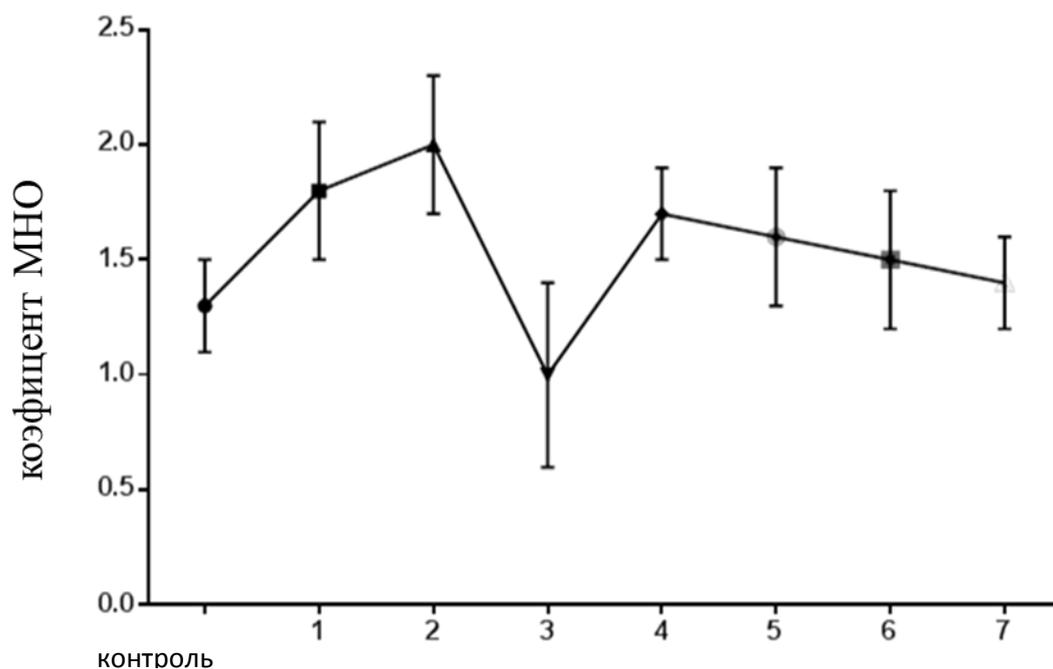
Протромбин или коагуляционный фактор II участвует в конечной стадии коагуляции крови. Это витамин К-зависимый гликопротеин, который относится к альфа2-глобулинам, синтезируется в клетках печени и секретируется в кровь. При коагуляции крови протромбин (неактивная форма) превращается в тромбин (сериновая протеаза) путем протеолиза факторами Ха и Va, в присутствии ионов кальция и фосфолипидов. Далее, образовавшийся тромбин превращает фибриноген в нерастворимые сгустки фибрина ([http://medbiol.ru/medbiol/blood\\_dis/00117247.htm](http://medbiol.ru/medbiol/blood_dis/00117247.htm)).

Несмотря на то, что в нашей работе, колебания для средних значений международного нормализованного отношения, протромбинового времени (ПВ) и протромбинового соотношения были выявлены, никаких достоверных изменений не было обнаружено для этих параметров (Рисунок 3.24; Рисунок 3.25; Рисунок 3.26).



**Рисунок 3.25.** Изменение показателя протромбинового соотношения (%) в динамике АЧС.

На оси ординат проценты, на оси абсциссы: дни после инфекции. ( $M \pm SD$ )

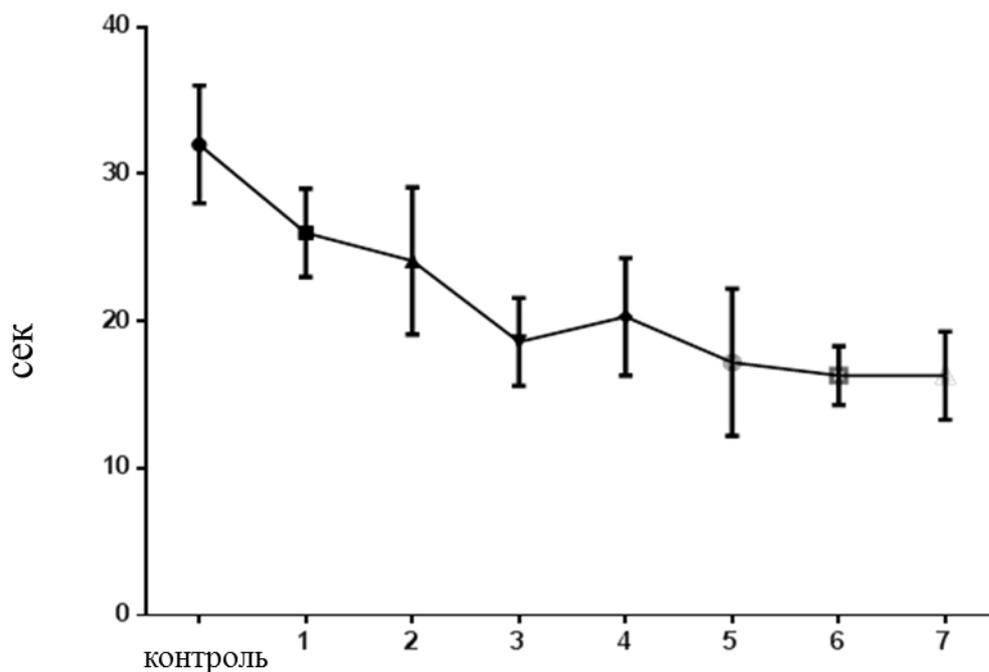


**Рисунок 3.26.** Изменение показателя Международного нормализованного соотношения (МНО) в динамике АЧС.

*Ось абсцисс:* коэффициент МНО; *Ось ординат:* дни после инфекции. (M±SD)

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) отражает состояние внутреннего пути свертывания и уровень фактора XII, фактора XI, фактора IX, фактора VIII, и других.

При нарушениях общего пути свертывания (начиная от активации фактора X) изменяются оба показателя АЧТВ и ПВ. Удлинение АЧТВ и ПВ, рефрактерное к добавлению нормальной плазмы, говорит о наличии ингибиторов свертывания. (<http://humbio.ru/humbio/har/000b0a0f.htm>). В наших исследованиях (Рисунок 3.27) наблюдалась выраженная тенденция к сокращению АЧТВ ( $p < 0.1$  на 3-6 день) в течение всего эксперимента.

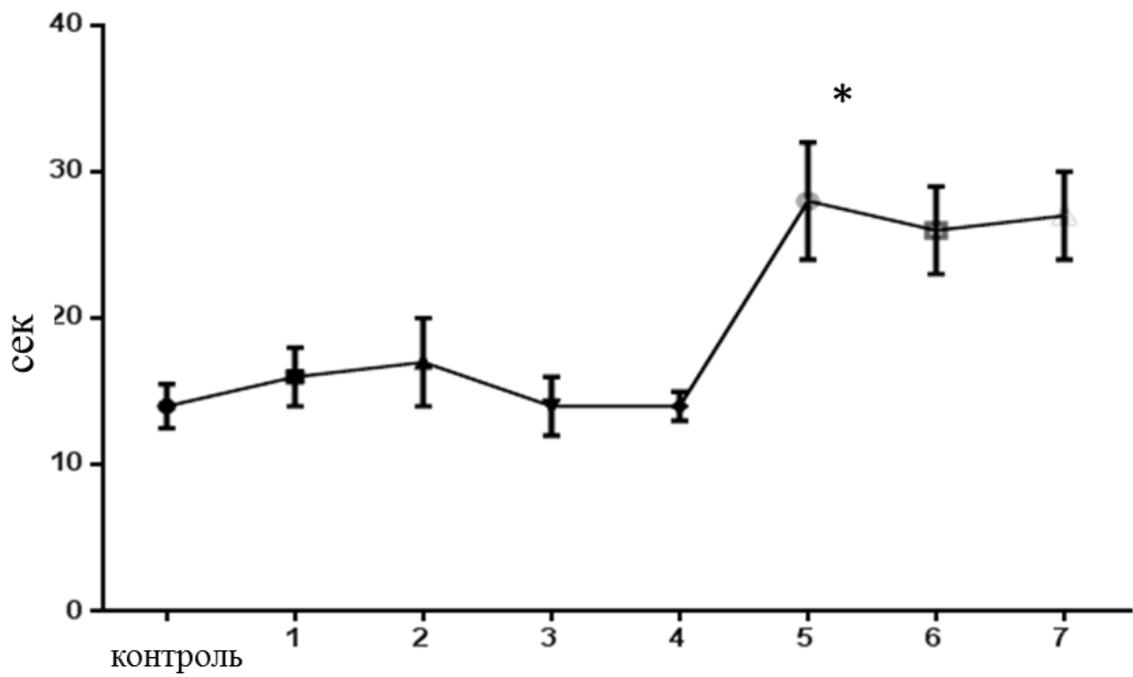


**Рисунок 3.27.** Изменение Активированного частичного тромбoplastинового времени (АЧТВ) в динамике АЧС.

*Ось абсцисс:* время (секунды); *Ось ординат:* дни после инфекции. \*-  $p < 0.05$  ( $M \pm SD$ )

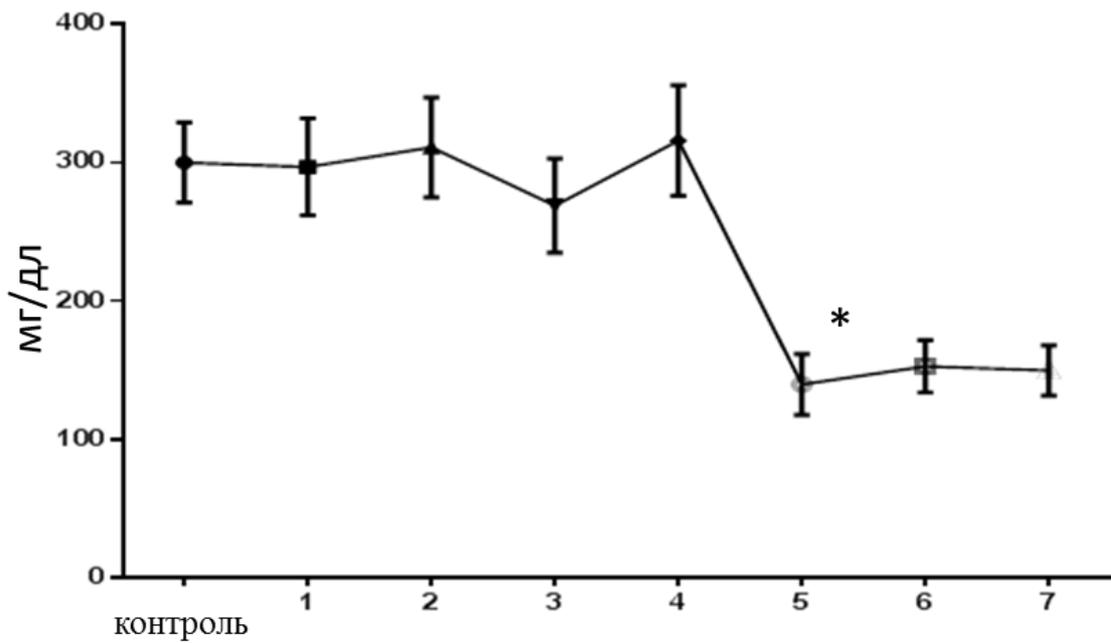
Тромбиновое время (ТВ) - это период последнего этапа свертывания крови, когда происходит превращение фибриногена в фибрин в цитратной плазме после добавления в неё тромбина и кальция. ТВ зависит от уровня фибриногена в крови: снижение уровня фибриногена увеличивает тромбиновое время, поэтому анализ последнего обычно совмещают с анализом фибриногена и других показателей коагулограммы (<http://profnauka.ru>). В ходе инфекции ТВ не отличалось у контрольных и инфицированных животных, до 5-го дни (Рисунок 3.28), когда наблюдалось значительное и резкое продление ( $p < 0.05$ ).

Уровень фибриногена показал небольшое увеличение и незначительное повышение на 4-ый день (316 мг/дл) и значительное, достоверное ( $p < 0.05$ ) снижение в последующий период, вплоть до конца инфекции (Рисунок 3.29).



**Рисунок 3.28.** Изменение тромбинового времени в динамике заболевания.

*Ось ординат:* время (сек); *Ось абсцисс* дни после инфекции. \*-  $p < 0.05$  ( $M \pm SD$ )

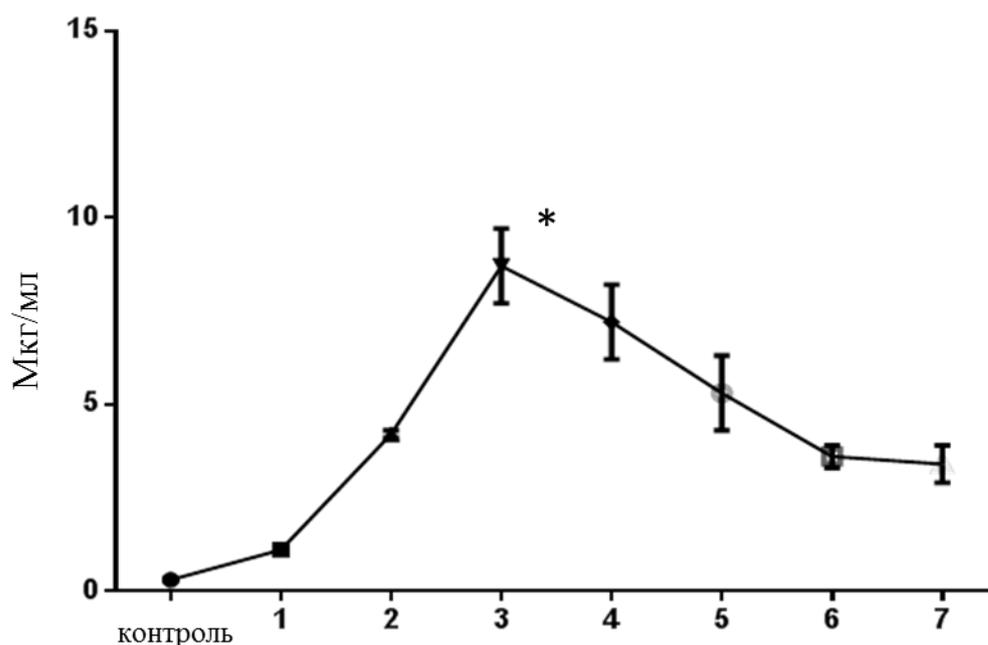


**Рисунок 3.29.** Изменение количества Фибриногена (Фактор I) в динамике заболевания.

*Ось ординат:* количество в мг/дл; *ось абсцисс:* дни. \*-  $p < 0.05$  ( $M \pm SD$ )

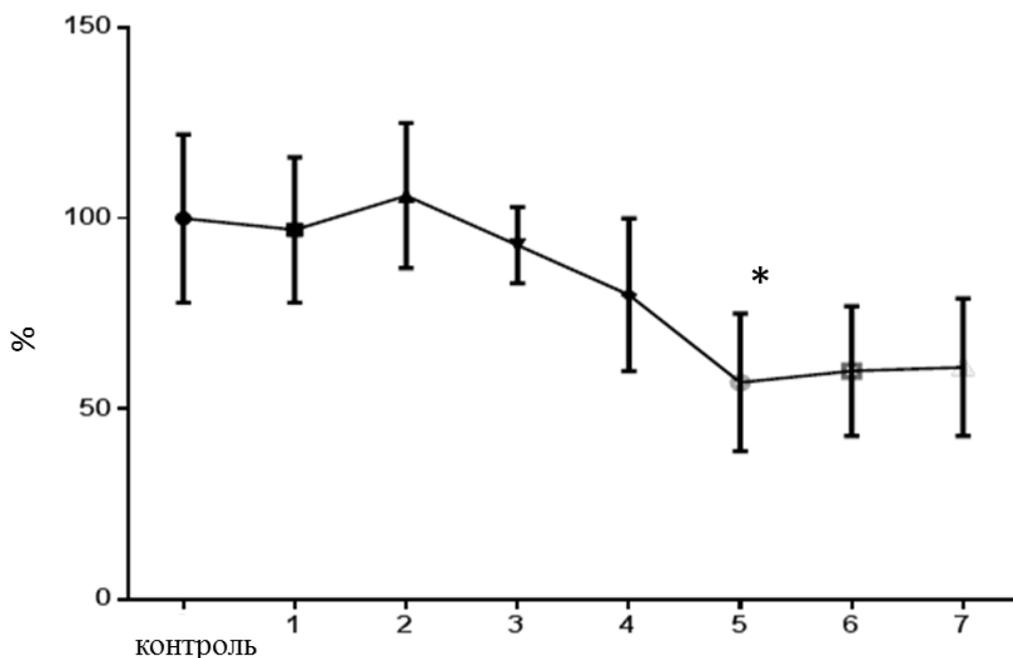
Антитромбин III — белок свертывающей системы крови, препятствующий свертыванию крови. Антитромбин контролирует свертывающую систему, обеспечивает нормальное свертывание крови и препятствует тромбообразованию в кровотоке ([http://profnauka.ru/about.php?id=200&url=%2Fcatalog%2F%3Fcat\\_id%3D132](http://profnauka.ru/about.php?id=200&url=%2Fcatalog%2F%3Fcat_id%3D132)) D-димер-продукт образующийся в результате распада тромба, состоящий из двух идентичных доменов. Наличие D-димеров в плазме указывает на полное разрушение сгустка. (<http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=24476>). В нашем эксперименте уровень D-димеров выше, чем в контроле, и достигает пика на 3-ий день (8,7 мг / мл) после чего уровень начинает снижаться, однако вплоть до конца заболевания его уровень остается достоверно выше контрольных значений ( $p < 0.01$ - $p < 0.05$ ).

Активность антитромбина III демонстрировала незначительную тенденцию к снижению (Рисунок 3.31) по сравнению со здоровыми свиньями только на 5-6 день ( $p < 0.1$ ).



**Рисунок 3.30** Изменение количества D-димеров в динамике заболевания.

*Ось ординат:* количество в мкг/мл; *ось абсцисс:* дни. \*-  $p < 0.05$  ( $M \pm SD$ )



**Рисунок 3.31.** Изменение активности Антитромбина III в динамике АЧС.

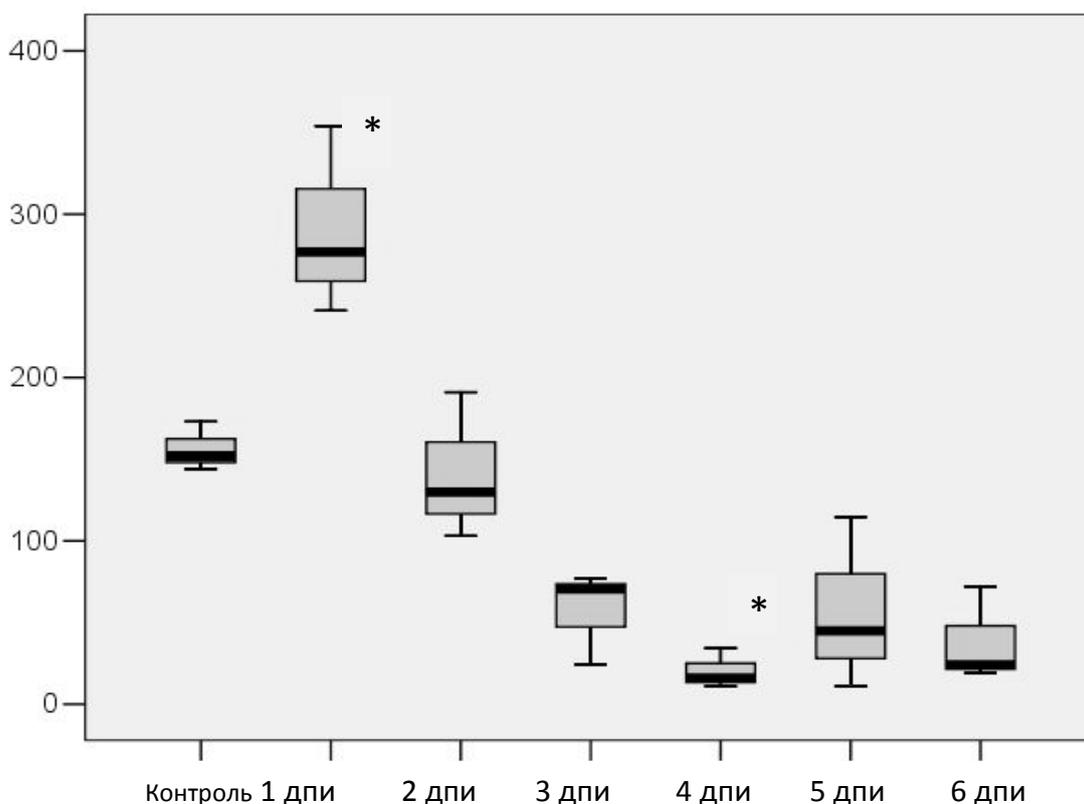
*Ось абсцисс:* проценты; *ось ординат:* дни после инфекции. \*-  $p < 0.1$  ( $M \pm SD$ )

Таким образом, нами показано нарушение системы свертывания крови у свиней зараженных 2-ым генотипом вируса африканской чумы свиней. Нарушение свертываемости крови проявлялось в удлинении ТВ и снижении уровня фибриногена, увеличении количества D-димеров и удлинении АЧТВ, а так же снижением активности антитромбина III на последних днях заболевания.

### 3.6 ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ТПО В ДИНАМИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Тромбопоэтин (ТПО) является важнейшим регулятором процесса созревания и дифференцировки мегакариоцитов и образования тромбоцитов (Kaushansky K et al, 1994). Было показано, что различные концентрации ТПО по-разному влияют на тромбоциты, так, например, при сверхфизиологических концентрациях  $ТПО > 100 \text{ нг/мл}$  идет агрегация тромбоцитов в условиях *in vivo* (Hitchcock I & Kaushansky K. 2014) тогда как физиологические концентрации ТПО способствуют реактивности тромбоцитов с другими

агонистами (van Willigen et al, 2000). Низкие концентрации ТПО (0.01-1нг/мл) способствуют ускоренной адгезии тромбоцитов на фактор фон Виллебранда и без возможности отсоединения, что указывает на то, что ТПО может играть важную роль в образовании тромбов (van Os E. et al,2003). В связи со всем этим, а так же на основе полученных данных о количественных изменениях в популяции предшественников тромбоцитов и их плоидности нами были исследованы количественные изменения ТПО в динамике заболевания АЧС.



**Рисунок 3.32.** Изменение уровня ТПО в периферической крови в динамике АЧС.

На оси ординат: количество в пг/мл. На оси абсцисс: дни. \*-  $p < 0.05$  ( $M \pm SD$ )

Полученные данные (Рисунок 3.32) указывают на то, что на 2-ой день происходит резкое достоверное ( $p < 0.05$ ) повышение количества ТПО в периферической крови у больных животных. 3-ий день характеризуется снижением количеств ТПО по сравнению с предыдущим днем. На 4-ый день значение количества ТПО достигает минимального значения в ходе заболевания и составляет примерно 20пг/мл. Необходимо отметить, что после резкого скачка на 2-ой день и резкого снижения на 4-ый день, показатели ТПО не достигают нормальных значений до последнего дня заболевания.

## ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, нами рассмотрена патология ССК при АЧС. Патология ССК при АЧС, рядом авторов рассматривается как ведущая патогенетическая единица в общем патогенезе АЧС (Blome S. et al, 2013; Anderson E.C. 1986). В экспериментах Вилледа и др ( Villeda C. et al, 1993) животные заражались штаммом Mw'83. При этом наблюдалось значительное нарушение гемостаза проявляемое удлинением АЧТВ, ПВ и ТВ, что объясняется потерей активности факторов свертывания, как внешнего так и внутреннего пути. На 5-ый день, когда клинические симптомы были явно выражены, активность факторов свертывания снизилась на 30-40% по сравнению с их начальной активностью. Необходимо отметить, что прогрессивное увеличение мономера фибрина было замечено на 3-ий день и другими авторами (Gómez-Villamandos J et al, 1997). По мнению авторов одним из возможных механизмов, объясняющих активацию факторов коагуляции и, как следствие, возникновение ДВС при острой форме АЧС, может быть прямое или опосредованное действие вируса на эндотелий стенок сосудов. В своих работах со штаммом Mw'83 Андерсон и др (Anderson E et al, 1987) показали, что до 3-го дня идет синтез простоциклина со стороны эндотелия, однако затем этот синтез нарушается. Интересно то, что простоциклин вызывает агрегацию тромбоцитов, вазодилатацию и повышение проницаемости сосудов, и приводит к нарушению циркуляции крови и коллапсу органов. В ультраструктурных исследованиях почек свиней, инфицированных вирулентным штаммом E70, репликация вируса в эндотелиальных клетках почечных интерстициальных капилляров обнаружена лишь на 7-ой день (Sierra M et al, 1989). Эти данные позволяют предположить, что вирус АЧС вызывает повреждение эндотелия с помощью непрямого механизма и/или на заключительном этапе заболевания. Другой механизм, который также может быть вовлечен в активацию каскада свертывания, был замечен при исследовании селезенки свиней зараженных штаммом Mw'83 (Carrasco L et al, 1992). Репликация вируса в макрофагах прилегающих к мышечным клеткам корды селезенки и их последующий некроз, привели к адгезии тромбоцитов на коллагеновых волокнах оголенных мышечных клеток, в результате чего, возможно, идет активация каскада свертывания с последующей генерацией фибрина. В нормальных условиях клетки системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) защищают организм от ДВС путем удаления активированных факторов свертывания крови и растворимого фибрина. При

острой АЧС, клетки принадлежащие к СМФ, в частности, клетки Купфера и легочные внутрисосудистые макрофаги (PIM), показали наличие вирусной репликации и некротических изменений в течение трех дней после инокуляции (Sierra M et al, 1990; Sierra M et al, 1987). Инфекционное поражение СМФ способствует увеличению тяжести ДВС. После образования тромбина и его циркуляции в крови в течение развития процессов коагуляции, активируются несколько механизмов, чтобы ограничить его беспрепятственное действие. Два важных механизма для предотвращения действия тромбина: 1) антитромбин III (АТ III), как естественный ингибитор тромбина, 2) активация фибринолитической системы. Авторы Вилледа и др ( Villeda C et al, 1993) показали, что существует значительное снижение активности АТ III и плазминогена на 4-й день АЧС, которое не наблюдалось в случае подострой формы инфекции. Эти выводы означают, что потребление АТIII и активация фибринолитической системы может усугубить склонность к кровотечениям при острых инфекциях вирусом АЧС. В работе других авторов (Edwards J & Dodds 1985). Было показано, что при инфицировании свиней штаммом DR'79 количество тромбоцитов не уменьшалось до 3-го дня, но начиная с 5-го дня их количество достоверно снижалось, достигая минимальных значений на 10 день инфекции, после чего снова возрастает, доходя до контрольных значений на 14-ый день. Методом иммунофлуоресцентного анализа было показано, что вирус поражает мегакариоциты, однако в очень малых количествах от общего числа мегакариоцитов. Более того, на препаратах были отмечены клетки всех этапов созревания мегакариоцитов, т.е. при заражении животных процесс созревания этих клеток не нарушается. В этой работе также было показано, что нет никаких морфологических признаков нарушения образования и созревания тромбоцитов. Все вышесказанное дает возможность предположить, что наблюдаемая тромбоцитопения является причиной потребления тромбоцитов при образовании тромбов в периферической крови. Однако, исследования изменений в костном мозге в динамике АЧС вызванным штаммом E75 выявили поражение 25-30% мегакариоцитов на 6-ой день (Rodriguez F. et al, 1996a; Rodriguez F. et al, 1996b). Последнее совпадает с проявлением тромбоцитопении так же на 6-ой день. Таким образом, ухудшение созревания и уничтожение прекурсоров тромбоцитов, возможно играет важную роль в генезисе тромбоцитопении. Однако необходимо отметить, что у данных авторов не наблюдалось заражения тромбоцитов в периферической крови. Это

объяснялось тем, что инфицированные мегакарициты разрушаются в костном мозге и не созревают до образования тромбоцитов. В противоположность этому, Perez и др. (Perez J. et al, 1997). продемонстрировали более низкий процент зараженных мегакарицитов как при инфекции штаммом высокой вирулентности (Малави '83), так и с умеренно вирулентным (DR '78) штаммом АЧС. Кроме этого, Эдвардс и другие (Edwards J. et al, 1984) в исследованиях относительно функциональных изменений, а именно выживаемости тромбоцитов, показали что, несмотря на очевидную тромбоцитопению, тромбоцитопоз был нормальным во время инфекции. Гомес-Виламандос и др., (Gomez-Villamandos J. et al, 1997a.) также показали, что ни сосудистые изменения, ни вирусная репликация в различных популяциях клеток костного мозга не привели к нарушению функций костного мозга.

В проделанной нами работе было выявлено:

1. Увеличение количества тромбоцитов, размерами меньше нормы, наблюдаемое с первого дня инфекции, может свидетельствовать о нарушении образования новых тромбоцитов в костном мозге на ранних стадиях заболевания или же утилизация молодых тромбоцитов в образовании микротромбов характерных для АЧС. Появление больших и гигантских тромбоцитов начиная с 4 дня заболевания может быть связано с нарушениями тромбоцитопоеза в костном мозге из-за наличия вируса в прогениторных клетках и/или быть следствием компенсаторных изменений, так как по данным литературы появление не типично маленьких и больших тромбоцитов чаще встречается при тромбоцитопениях, когда костный мозг не успевает восполнять недостаток тромбоцитов и идет ускоренное образование минуя стадии созревания (Kraytman M. 1971)
2. В ходе инфекции во всех трех популяциях прогениторов мегакарицитов идет сдвиг гистограммы распределения ядер по плоидности вправо. Данные изменения носят компенсаторный характер и направлены на усиленную пролиферацию мегакарицитов для восполнения количества тромбоцитов в периферической крови.
3. Нарушение свертываемости крови проявлялось в удлинении тромбинового времени и снижении уровня фибриногена, повышении количество D-димеров и замедлении АЧТВ. Активность Антитромбина III незначительно понижалась. Остальные показатели существенных изменений не проявили.

Таким образом, анализируя и сравнивая данные различных авторов с нашими результатами мы выявили ряд совпадений и различий. В своем эксперименте Вилледа и др (Villeda C. et al, 1993) показали, что количество тромбоцитов уменьшается с первого дня и достигает минимума на 3 день, после чего количество тромбоцитов начинает увеличиваться, однако до последнего дня не достигает контрольных значений. Эти данные не совпадают с данными нашего эксперимента, где количество тромбоцитов увеличивается в 1-ый день, и лишь потом начинает снижаться достигая минимального значения на 3-ий день и сохраняет это значение вплоть до последнего дня заболевания. В работе Gómez-Villamandos J. et al, 1997) показано аналогичное снижение количества тромбоцитов на 3 день, и сохранение значений ниже контрольных до конца эксперимента. Однако наши данные отличаются от данных эксперимента проделанного Эдвардс и др (Edwards J. et al, 1985) в которой было показано, что количество тромбоцитов возрастает с начала инфекции, а на 3 день достигает максимального значения и лишь после 3-го дня начинает снижаться, достигая минимального значения на 8-ой день и затем еще больше снижается на 10-ый день после чего количество тромбоцитов начинает возрастать и с 12-го дня резко повышается, доходя до контрольных значений на 14-ый день болезни. Причиной таких результатов, и отличий от наших данных скорей всего служит то, что во всех описанных выше экспериментах, включая и наш эксперимент, штамм вируса вызывал острую форму АЧС, в то время как в последнем случае (Edwards J. et al, 1985) эксперимент проводился со штаммом вируса, вызывающий умеренную форму АЧС и, как следствие, более длительное течение заболевания, чем и объясняется восстановление количества тромбоцитов.

Изменения показателей таких факторов как АЧТВ и ПВ в ходе АЧС было исследовано (Villeda C. et al, 1993). Согласно их данным с 1-го дня до последнего дня заболевания идет удлинение АЧТВ достоверное, начиная с 4-го дня. Так же наблюдается достоверное удлинение ПВ, начиная с 5 дня. Аналогичные данные были описаны у Эдвардс и др (Edwards J. et al, 1984). Наши данные не совпадают с этими результатами, так как при инфекции АЧС (генотип 2 ) наблюдалась обратная картина, а именно, тенденция к сокращению АЧТВ достоверное с 3-го по бой день. Достоверных изменений ПВ в наших экспериментах не наблюдалось. Данное несоответствие может объясняться различными генотипами вируса и соответственно различным течением заболевания, несмотря на то, что

все описанные результаты были получены в экспериментах со штаммами, вызывающими острую форму АЧС. При том, что происхождение и механизмы укорочения АЧТВ неизвестны, это явление описано при различных патологиях, включая вирусную инфекцию (Molinas F. et al, 1983). Укорочение АЧТВ в этом эксперименте, возможно, отображает дисбаланс прокоагулянтов как следствие повышения уровня различных факторов свертывания крови, таких как тканевой фактор, высвобождаемых макрофагами и клетками эндотелия (Vallee I. et al, 2001). Данные полученные по изменениям тромбинового времени и количества фибриногена в экспериментах Виледа и др (Villeda C. et al, 1993), показывают, что на 2-ой день болезни идет увеличение уровня фибриногена в плазме зараженных животных достигающее максимального значения на 3-ий день. Затем наблюдается постепенное снижение показателя на 7-ой и 8-ой день, уровень фибриногена составляет менее 50% от контрольных значений. Эти данные совпадают с нашими результатами, однако в нашем эксперименте уровень фибриногена не изменялся до 4-го дня, после чего снизился до минимальных значений. Здесь может играть роль метод заражения животных, так как при внутримышечном введении инфекции ход клинических проявлений ускоряется.

Достоверное изменение тромбинового времени (ТВ) у С. J. Villeda, (1993) указано начиная с 5 дня и показывают его удлинение до последнего дня заболевания. В нашей работе мы так же показали удлинение тромбинового времени, начиная с 5-го дня.

Активность антитромбина III по данным Виледа и др (Villeda C. et al, 1993), стала достоверно снижаться на 4-ый день. В нашей работе этот показатель оставался статистически неизменным до 5-го дня, где наблюдалась незначительная тенденция к снижению активности. Данное отличие можно объяснить методом экспериментального заражения: было показано, что внутримышечное введение дает более быструю вирусную репликацию по сравнению с интраназальным и пероральным введением (Guinat C. et al, 2014)

Мы впервые исследовали изменения показателей D-димеров и выявили, что их количество достигает пика на 3 день, затем идет на спад. Эти данные позволяют предположить, что на начальном этапе инфекции активируется не только свертывающая система крови, но и антисвертывающая система, которая затем ослабевает, что весьма интересно, так как не совпадает с данными на 1-2 дни по агрегации тромбоцитов, где идет

резкое увеличение количества агрегированных тромбоцитов, на фоне увеличения количества продукта их распада, однако снижается параллельно с изменениями уровня D-димеров.

Нами впервые были изучены изменения количественного соотношения и плоидности популяции клеток прогениторов мегакариоцитов в динамике инфекции. Полученные нами данные указывают на то, что в ходе инфекции происходят изменения направленные на восполнение количества потерянных тромбоцитов, так как сдвиги гистограмм распределения ядер по плоидности в значительной мере совпадают с точками уменьшения количества тромбоцитов. Кроме того изменения соотношения прогениторов различной степени созревания в костном мозге также совпадают с изменениями количества тромбоцитов в периферической крови. Более того, необходимо отметить, что на отпечатках костного мозга нами не обнаружены атипичные или поврежденные мегакариоциты, или их прогениторы, что совпадает с данными литературы (Edwards J. et al, 1985) и подтверждает гипотезу, что наблюдаемая тромбоцитопения является следствием усиленного потребления тромбоцитов в периферической крови при тромбообразовании. В пользу этого также говорят наши данные по частоте встречаемости прогениторов/мегакариоцитов, постепенно снижающиеся в ходе инфекции.

Также нами впервые были исследованы изменения показателя тромбопоэтина (ТПО). По нашим данным уровень ТПО достоверно поднимается на 1-ый день, что объясняет изменения в количестве тромбоцитов. Этот факт вызывает большой интерес, так как совпадает с увеличением плоидности прогениторов тромбоцитов (Kaushansky K. et al, 1994) и противоположен уменьшению количества тромбоцитов, так как по данным (Hitchcock I. & Kaushansky K., 2014 ) регуляция уровня ТПО в крови осуществляется путем захвата со стороны тромбоцитов крови, и, следовательно, его уровень должен был возрасти, а не снижаться. Однако в работе Эмоннс и др (Emmons R. et al, 1996) было показано, что при тромбоцитопениях различного генеза несмотря на эквивалентное количество тромбоцитов, уровни ТПО резко отличаются. Так при тромбоцитопении обусловленной деструкцией тромбоцитов в периферии, наблюдалось снижение количества ТПО, и/или неопределяемые количества <200 пг/мл. А в работе с другим геморрагическим вирусом Денге, было показано, что тромбоцитопения, наблюдаемая в ходе этого заболевания, опосредована снижением

количества мегакариоцитов в костном мозге, однако синтез ТПО со стороны вируса не подавляется (Sridharan A. et al, 2013).

Итак, нами показано поражение ССК как на клеточном так и на гуморальном уровне. Эти нарушения характеризуются патологией тромбоцитов, ускоренной пролиферацией клеток предшественников тромбоцитов, усиленным тромбообразованием и активацией системы направленной на тромболиз.

Причиной подобных явлений может быть:

- а) прямое действие вируса на эти клетки
- б) развитие системных поражений в организме зараженных животных.

Прямое действие вируса не объясняет наши результаты: не наблюдается поражение тромбоцитов нашим вирусом, мегакариоциты поражаются на поздних стадиях, что показано различными авторами, а в наших опытах не обнаружено массивных инфекций мегакариоцитов. Вследствие этого мы склонны считать что здесь имеет место системная патология. Одним из наиболее вероятных патогенетических механизмов, с нашей точки зрения является диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС).

Согласно ВОЗ синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания это аномальная активация систем свертывания и фибринолиза, приводящая к недостатку тромбоцитов, факторов свертывания крови и фибриногена, продукт распада фибрина обнаруживается в крови.

В начальном периоде синдрома ДВС гиперкоагуляция, весьма кратковременная, что совпадает с нашими данными на 1-2 дни.

Затем наступает II фаза синдрома ДВС — переходная, (3 сутки) и характеризуется одновременной , гиперкоагуляцией (например, укорочение общего времени свертывания крови), и — нормо- или гипокоагуляцией.

В терминальной гипокоагуляционной фазе, которая развивается далеко не всегда, увеличиваются все показатели времени свертывания, сгустки становятся малыми, рыхлыми, отмечается выраженная гипофибриногенемия.

Все три стадии и их характеристик совпадают с нашими данными по состоянию системы свертывания в динамике острой АЧС

Ранее нами уже было показано, что у свиней при АЧС наблюдался подъем уровней сывороточных провоспалительных цитокинов (Zakaryan H. et al, 2015), а позднее было сделано предположение (Симонян Л. & Каралян З. 2015), что в ходе АЧС вызванной 2-ым генотипом у животных на 3-4 день болезни начинает развиваться синдром системного воспалительного ответа. Подтверждением этому служит и тот факт, что ДВС в основном наблюдается у пациентов с синдромом системного воспалительного ответа и является важнейшим фактором определяющим течение заболевания (Gando S. et al, 1996). Таким образом, учитывая патологию ССК в дополнение к выше изложенному, мы можем заключить, что в основе патогенеза АЧС лежит развитие синдрома ДВС, как основного компонента синдрома системного воспалительного ответа.

## ВЫВОДЫ

1. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом II, после кратковременного повышения количества тромбоцитов на начальном этапе заболевания, возникает выраженная тромбоцитопения, продолжающаяся до конца заболевания. Одновременно с тромбоцитопенией наблюдается появление гигантских тромбоцитов и внутрисосудистая адгезия тромбоцитов.
2. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2 на начальном этапе было показано достоверное повышение сывороточных уровней тромбopoэтина на 1-ый день, что объясняет кратковременное повышение количества тромбоцитов.
3. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2 уровень D-димеров в крови повышается на пике заболевания (3-4 дни), что свидетельствует об активации тромболиза на данном этапе.
4. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2, во всех трех популяциях мегакариоцитов (промегакарициты, базофильные и азурофильные мегакарициты) идет сдвиг гистограммы распределения ядер по плоидности вправо. Данные изменения носят компенсаторный характер и направлены на усиленную пролиферацию мегакариоцитов для восполнения количества тромбоцитов в периферической крови.
5. В динамике острой АЧС, вызванной генотипом 2, терминальная стадия заболевания характеризуется удлинением тромбинового времени, снижением уровня фибриногена, удлинением АЧТВ. Активность Антитромбина III также незначительно понижалась.
6. Выявленные нарушения в динамике острой АЧС, вызванной генотипом II, указывают на развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), что характерно при развитии ряда заболеваний с системными нарушениями иммунитета, в частности для синдрома системного иммунного ответа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agriculture.// Statistical Yearbook of Armenia. 2014; 306
2. Anderson E, Williams S, Fisher-Hoch S, Wilkinson P. Arachidonic acid metabolites in the pathophysiology of thrombocytopenia and hemorrhage in acute African swine fever. // Res Vet Sci. 1987; 42:387-394.
3. Anderson E.C. African swine fever: Current concepts on its pathogenesis and immunology. //Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 1986; 5(2):477-486.
4. Aslam R, Speck E, Kim M, Crow A, Bang K. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. // Blood. 2006; 107: 637–641.
5. Banu N, Wang J, Deng B, Groopman J, Avraham H. Modulation of Megakaryocytopoiesis by Thrombopoietin: The c-Mpl Ligand. // Blood. 1995; 86(4):1331-1338.
6. Bartley T, Bogenberger J, Hunt P, Li Y-S, Lu H-S, Martin F, Chang M-S, Samal B, Nichol J, Swift S, Johnson M, Hsu R-Y, Parker V, Suggs S, Skrine J, Merewether L, Clogston C, Hsu E, Hokom M, Hornkohl A, Choi E, Pangelinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L, Jacobsen F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Elliott G, Izumi R, Covey T, Crouse J, Garcia A, Xu W, Del Castillo J, Biron J, Cole S, Hu MC-T, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Bosselman RA. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor. // Mpl. Cell. 1994; 77:1117-1124.
7. Bentfeld-Barker M, Bainton D. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. //Blood. 1982; 59: 472 – 481.
8. Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, Mason P, Baxt B. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. //J Virol. 1995; 69: 2664–2666.

9. Bernd van der Loo, John F. Martin . A Role for Changes in Platelet Production in the Cause of Acute Coronary Syndromes. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:672-679.
10. Bick R. Disseminated intravascular coagulation and related syndromes: a clinical review. // *Semin Thromb Hemost.* 1988; 14(4):299-338.
11. Blacksell, S. Genetic characterisation of classical swine fever viruses from Lao PDR collected during 1997 and 1998.: // *Classical Swine Fever and Emerging Diseases in Southeast Asia. Aciar Proceedings.* 2000, 94;57–61.
12. Blome S, Gabriel C, Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. // *Virus Res.* 2013; 173:122– 130.
13. Bodin S, Soulet C, Tronchere H, Sié P, Gachet C, Plantavid M, Payrastra B. Integrin - dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. // *J Cell Sci.* 2005; 118:759–769.
14. Boudreaux M. Platelets. Schalm's veterinary hematology. – 6th ed.// 2010; Ch 75:561.
15. Calderoni N, Paasch L, Bouda J. Haematological and histological bone marrow findings in experimental classical swine fever. // *Acta vet. Brno.* 1997; 66:171-176.
16. Cao W, Henry M, Borrow P, Yamada H, Elder J. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. // *Science.* 1998; 282: 2079–2081.
17. Carrasco L, Bautista M, Gómez-Villamandos J, Martín de las Mulas J, Chacón-M de Lara F, Wilkinson P, Sierra M. Development of microscopic lesions in splenic cords of pigs infected with African swine fever virus. // *Vet Res.* 1997; 28(1):93-99.
18. Carrasco L, Fernafidez A, Gdmez-Villamandos J, Mozos E, M6ndez A, Jover A. Kupffer cells and PIMs in acute experimental African swine fever. // *Histol Histopathol.* 1992; 7:421-425.
19. Cerutti A, Custodi P, Duranti M, Noris P, Balduini C. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. // *Br J Haematol.* 1997; 99(2):281-284.

20. Chapman D, Tcherepanov V, Upton C, Dixon L. Comparison of the genome sequences of a pathogenic and apathogenic African swine fever virus isolates. // *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 397–408.
21. Chelucci C, Federico M, Guerriero R, Mattia G, Casella I. Productive human immunodeficiency virus-1 infection of purified megakaryocytic progenitors/precursors and maturing megakaryocytes. // *Blood.* 1998; 91:1225–1234.
22. Clemmons R, Bliss E, Dorsey-Lee M, Seachord C, Meyers K. Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. // *Thromb Haemost.* 1983; 50(4):838-843.
23. Colman W. Contact activation (kallikrein - kinin) pathway: multiple physiologic and pathophysiologic activities. In: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins. 2006; 107 – 130
24. Colson P, de Lamballerie X, Fournous G, Raoult D. Reclassification of Giant Viruses Composing a Fourth Domain of Life in the New Order Megavirales. // *Intervirology.* 2012;55:321–332.
25. Cotran R, Pober J. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. // *J Am Soc Nephrol.* 1990; 1(3):225-35.
26. Crapnell K, Zanjani E, Chaudhuri A, Ascensao J, Jeor S. In vitro infection of megakaryocytes and their precursors by human cytomegalovirus. // *Blood.* 2000; 95:487–493.
27. Crawley J, Zanardelli S, Chion C, Lane D. The central role of thrombin in hemostasis. // *J Thromb Haemost.* 2007; 5:95 – 101.
28. D’Andrea G, Chetta M, Margaglione M. Inherited platelet disorders: thrombocytopenias and thrombocytopathies. // *Blood Transfusion.* 2009;7(4):278-292.
29. de Sauvage F, Hass P, Spencer S, Malloy B, Gurney A, Spencer S, Darbonne W, Henzel W, Wong S, Kuang W, Oles K, Hultgren B, Solberg L, Goeddel D, Eaton D.

- Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. // Nature. 1994; 369(6481):533-538.
30. de Villiers E, Gallardo C, Arias M, da Silva M, Upton C, Martin R, Bishop R. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. // Virology. 2010; 400(1):128-36.
  31. Debbie J, Abelseth M. Pathogenesis of epizootic hemorrhagic disease. Blood coagulation during viral infection. // J Infect Dis. 1971; 124(2):217-22.
  32. Debili N , Coulmobel L , Croiselle L . Characterization of a bipotenterythro - megakaryocytic progenitor in human bone marrow. // Blood. 1996; 88:1284 – 1296.
  33. Dell ' Orco M , Bertazzolo W, Pagliaro L. Hemolytic - uremic syndrome in a dog. // Vet Clin Pathol. 2005; 34:264 – 269.
  34. Depner K, Bouma A, Koenen F, Klinkenberg D, Lange E, de Smit H, Vanderhallen H. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows. // Veterinary Microbiology. 2001; 83:107–120.
  35. DeTray D, Scott G. Blood changes in swine with African swine fever. // Am J Vet. 1957; 18:484–497.
  36. Dixon L, Escribano J, Martins C, Rock D, Salas M, Wilkinson P. Asfarviridae. In:Fauquet CM, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L. Virus taxonomy:eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. // Elsevier Academic Press; 2005; 135–43.
  37. Dorahy D, Linez L, Meldrum C. Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. // Biochem J. 1996; 319:67–72.
  38. Ebbe S, Phalen E, Yee T. Postirradiation thrombocytopoiesis: suppression, recovery, compensatory states, and macromegakaryocytosis. // Prog Clin Biol Res.1986; 215:71-89.

39. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel J, Léon C, Lanza F, Gachet C. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. // *Blood*. 2014; 6;123(6):921-30.
40. Edwards J, Dodds W, Slauson D. Coagulation changes in African swine fever virus infection. // *American Journal of Veterinary Research*. 1984; 45(11):2414–2420.
41. Edwards J, Dodds W, Slauson D. Megakaryocytic Infection and Thrombocytopenia in African Swine Fever. // *Vet Pathol*. 1985; 22:171.
42. Emmons R, Reid D, Cohen R, Meng G, Young N, Dunbar C, Shulman N. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. // *Blood*. 1996; 15;87(10):4068-4071.
43. Enjuanes L, Carrascosa A, Moreno M, Vinuela E. Titration of African Swine Fever (ASF) Virus. // *J. gen.Virol*. 1976; 32:71-477.
44. Enticknap J, Lansley T, Davis T. Reduction in blood platelet size with increase in circulating numbers in the postoperative period and a comparison of the glass bead and rotating bulb methods for detecting changes in function. // *J Clin Pathol*. 1970; 23(2):140-143.
45. Fielder P, Gurney A, Stefanich E, Marian M, Moore M, Carver-Moore K, de Sauvage F. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. // *Blood*. 1996; 87(6):2154-61.
46. Gailani D, Renne T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? // *J Thromb Haemost*. 2007; 5:1106 –1112.
47. Galindo I, Cuesta-Geijo M, Hlavova K, Munoz-Moreno R, Barrado-Gil L, Dominguez J, Alonso C. African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin and cholesterol-dependent endocytosis. // *Virus Res*. 2015; 200:45-55.

48. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Nakanishi Y. Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. // *Thromb Haemost.* 1996; 75(2):224-228.
49. Garciabeato R, Salas M, Vinuela E, Salas J. Role of the host-cell nucleus in the replication of African swine fever virus-DNA. // *Virology.* 1992b; 188(2):637-649.
50. Garg S, Amorosi E, Karpatkin S. Use of the Megathrombocyte as an Index of Megakaryocyte Number. // *N Engl J Med.* 1971; 284:11-17.
51. Gavrilovskaya I.N, Brown E.J, Ginsberg M.H, Mackow E.R. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins.// *J Virol.* 1999; 73:3951-3959.
52. Gavrilovskaya N, Gorbunova E, Mackow E. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells. // *J Virol.* 2010; 84:4832-4839.
53. Gibellini D, Clò A, Morini S, Miserochi A, Ponti C, Carla Re M. Effects of human immunodeficiency virus on the erythrocyte and megakaryocyte lineages. // *World J Virol.* 2013; 2(2) 91-101.
54. Gomez-Villamandos C., Salguero F, Ruiz-Villamor E, Sanchez-Cordo P, Bautista N, Sierra M. Classical Swine Fever: Pathology of Bone Marrow. // *Veterinary Pathology.* 2003; 40 (2):157-163.
55. Gómez-Villamandos J, Bautista M, Carrasco L, Caballero M, Hervás J, Villeda C, Wilkinson P, Sierra M. African swine fever virus infection of bone marrow: lesions and pathogenesis. // *Vet Pathol.* 1997; 34(2):97-107.
56. Gomez-Villamandos J, Bautista M, Chacon-MdeLara F, Hervas J, Wilkinson P, Sierra M. Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in aviral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus. // *J CompPathol.* 1998; 118:1-13.

57. Gomez-Villamandos J, Bautista M, Hervás J, Carrasco L, de Lara F, Pérez J, Wilkinson P, Sierra M. Subcellular changes in platelets in acute and subacute African swine fever. // *Journal of Comparative Pathology*. 1996; 115(4):327–341.
58. Gómez-Villamandos J, Ruiz-Villamor E, Bautista M, Sánchez C, Sánchez-Cordón P, Salguero F, Jover A. Morphological and immunohistochemical changes in splenic macrophages of pigs infected with classical swine fever. // *J Comp Pathol*. 2001; 125(2-3):98-109.
59. Gordon M, Hoffman R . Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: Potential agents for the treatment of thrombocytopenia . // *Blood*. 1992; 80:302–307.
60. Gresele P, Page C., Fuster V, Vermilyen J. Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders. // *Pathophysiology, Pharmacology, and Therapeutics*. Cambridge, Cambridge University Press, 2002; 1124.
61. Guerriero A, Worford L, Holland H, Guo G, Sheehan K, Waller E. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. // *Blood*. 1997; 90(9):3444-3455.
62. Guinat C, Reis AL, Netherton CL, Goatley L, Pfeiffer DU, Dixon L. Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. // *Vet Res*. 2014; 45(1):93.
63. Harvey John. // *Atlas of veterinary hematology*. 2001; Ch 4:75
64. Harvey John. // *Atlas of veterinary hematology*. 2001; Ch 6:102
65. Heene D, Hoffmann-Fezer G, Müller-Berghaus G, Hoffmann R, Weiss E, Lasch H. Coagulation disorders in acute hog cholera. // *Beitr Pathol*.1971; 144(3):259-71.
66. Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, Kuga T, Kuroda H, Kusakabe T, Sasaki K, Fujikawa K, Kato J, Kogawa K, Koyama R, Niitsu Y. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. // *Blood*.1998; 92(1):46-52.

67. Hirsh J. Platelet age: its relationship to platelet size, function and metabolism. // *Br J Haematol.* 1972 Sep;23:Suppl:209-14.
68. Hitchcock I, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. // *British Journal of Haematology.* 2014; 165: 259–268.
69. Houwen B. Blood film preparation and staining procedures. // *Clin. Lab. Med.* 2002; 22:1–14.
70. Hovakim Zakaryan , Elena Karalova, Henrik Voskanyan , Zarine Ter-Pogossyan , Narek Nersisyan, Astghik Hakobyan, David Saroyana, Zaven Karalyan Evaluation of hemostaseological status of pigs experimentally infected with African swine fever virus. // *Vet. Microbiol.* 2014; 174(1-2):223-228.
71. <http://emedicine.medscape.com/article/199627-overview#a6>
72. Huang H, Chang H. Platelets in Inflammation and Immune Modulations: Functions Beyond Hemostasis. // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2012; 60:443–451.
73. Hukkanen R, Liggitt H, Murnane R, Frevert C. Systemic inflammatory response syndrome in nonhuman primates culminating in multiple organ failure, acute lung injury, and disseminated intravascular coagulation. // *Toxicol Pathol.* 2009; 37(6):799-804.
74. Hunt P. A bipotential megakaryocytic/erythrocyte progenitor cell: The link between erythropoiesis and megakaryopoiesis becomes stronger. // *J Lab Clin Med.* 1995; 125:303–304.
75. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated Platelets following Acute Blood Loss. // *Brit.J. Haemat.* 1969; 17(3):225-229.
76. Italiano J, Hartwig J. Megakaryocyte development and platelet formation. In: *Platelets . Burlington.* //Elsevier/Academic Press. 2007; 23 – 44.
77. Jin C, Liang M, Ning J, Gu W, Jiang H, Wu W, Zhang F, Li C, Zhang Q, Zhu H, Chen T, Han Y, Zhang W, Zhang S, Wang Q, Sun L, Liu Q, Li J, Wang T, Wei Q, Wang S, Deng Y, Qin C, Li D. Pathogenesis of emerging severe fever with thrombocytopenia

- syndrome virus in C57/BL6 mouse model. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:10053–10058.
78. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurl , Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins MB, Mier JW, Tilg H. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. // *Blood*. 2001; 98(9):2720-2725.
  79. Kaushansky K . Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. // *Blood*. 2008; 111: 981 – 986.
  80. Kaushansky K, Broudy V, Grossmann A, Humes J, Lin N, Ren H, Bailey M, Papayannopoulou T, Forstrom J, Sprugel K. Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy. // *J Clin Invest*. 1995; 96(3):1683-1687.
  81. Kaushansky K, Lok S, Holly R, Broudy V, Lin N, Bailey M, Forstrom J, Buddle M, Oort P, Hagen F. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. // *Nature*. 1994; 369(6481):568-71.
  82. Kaushansky K. The mpl ligand: molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development. // *Stem Cells*. 1994;12(1):91-96.
  83. Kaushansky K., Broudy V, Lin N, Jorgensen M, McCarty J, Fox N, Zucker-Franklin D, Lofton-Day C. Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92:3234–3238.
  84. Kessler U, Grau T, Gronchi F, Berger S, Brandt S, Bracht H, Marcucci C, Zachariou Z, Jakob S.M. Comparison of porcine and human coagulation by thrombelastometry. // *Thromb Res*. 2011; 128(5):477-82.
  85. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. // *Blood*. 1990; 75(1):116-21

86. Kitazawa T, Yoshino Y, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. Changes in the Mean Platelet Volume Levels after Bloodstream Infection Have Prognostic Value. // *Intern Med.* 2013; 52:1487-1493.
87. Kobayashi Y, Kondo M. Human megakaryocyte ploidy. // *Histol Histopathol.* 1999; 14:1223-1229.
88. Kraytman M.. Influence of Repeated Acute Thrombocytopenias on the Reappearance of Circulating Blood Platelets. // *Blood.* 1971, 37(3):323-329.
89. Kraytman M.. Platelet Size in Thrombocytopenias and Thrombocytosis of Various Origin. // *Blood.* 1973; 41(4): 587-598.
90. Krishnamurti C, Peat R, Cutting M, Rothwell S. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. // *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66: 435–441.
91. Kunz S, Rojek J, Perez M, Spiropoulou C, Oldstone M. Characterization of the interaction of lassa fever virus with its cellular receptor alpha-dystroglycan. // *J Virol.* 2005; 79: 5979–5987.
92. Kuter D, Rosenberg R. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. // *Blood.* 1995; 85(10):2720-2730.
93. Kuznar J, Salas M.L, Vinuela E. RNAs synthesized invitro by purified African swine fever virus. // *Archivos de Biologia y Medicina Experimentales.* 1980b. 13(4):465.
94. La Russa V, Innis B. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. // *Baillieres Clin Haematol.* 1995; 8: 249–270.
95. Lange A, Blome S, Moennig V, Greiser-Wilke I. Pathogenesis of classical swine fever–similarities to viral haemorrhagic fevers: a review. // *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2011; 124(1-2):36–47.
96. Levine R, Hazzard K, Lamberg J. The significance of megakaryocyte size. // *Blood* 1982; 60(5):1122-1131.

97. Li X, Jeffers L, Garon C, Fischer E, Scheffel J. Persistence of hepatitis C virus in a human megakaryoblastic leukaemia cell line. *J Viral Hepat.* 1999; 6:107–114.
98. Liess B. Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. // *Ann Rech Vet.* 1987; 18(2):139-45.
99. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. // *J. Med. Virol.* 2001; 63:143–149.
100. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkart D, Ching AFT, Mathewes S, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. // *Nature.* 1994; 369(6481):565-568.
101. Lütteke N1, Raftery MJ, Lalwani P, Lee MH, Giese T, Voigt S, Bannert N, Schulze H, Krüger DH, Schönrich G. Switch to high-level virus replication and HLA class I upregulation in differentiating megakaryocytic cells after infection with pathogenic hantavirus. // *Virology.* 2010; 405(1):70-80.
102. Mackman N , Tilley R, Key N. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis . // *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:1687 – 1693.
103. Malmquist W, Hay D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. // *Am. J. Vet. Res.* 1960; 1:104-108.
104. Malok M, Titchener H, Bridgers C, Lee Y, Bamberg R . Comparison of two platelet count estimation methodologies for peripheral blood smears. // *Clin. Lab. Sci.* 2007; 20:154–160.
105. Mannucci P, Sharp A. Platelet volume and shape in relation to aggregation and adhesion. // *Br J Haematol.* 1967; 13(4):604-617.

106. McCarty J, Sprugel K, Fox N, Sabath D, Kaushansky K. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. // *Blood*. 1995; 86(10):3668-3675.
107. McDonald T, Sullivan P. Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell. // *Exp Hematol*. 1993; 21:1316 – 1320.
108. McGurrin M , Arroyo L, Bienzle D . Flow cytometric detection of platelet- bound antibody in three horses with immune mediated thrombocytopenia. // *J Am Vet Med Assoc*. 2004; 224:83 – 87.
109. McNicol A , Israels S. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis . // *Thromb Res*. 1999; 95:1 – 18.
110. McVicar J, Mebus C, Becker H, Belden R, Gibbs E. Induced African swine fever in feral pigs. // *J Am Vet Med Assoc*. 1981; 179(5):441-446.
111. Meyers G, Rümenapf T, Thiel H. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. // *Virology*. 1989; 171:555–567.
112. Minter F, Ingram M. Platelet volume: density relationships in normal and acutely bled dogs. // *Br J Haematol*. 1971; 20(1):55-68.
113. Moennig V, Plagemann P. The pestiviruses. // *Adv Virus Res*. 1992; 41:53-98.
114. Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. // *Vet Microbiol*. 2000; 73(2-3):93-102.
115. Molinas, F.C., Giavedoni, E., Frigerio, M.J., Calello, M.A., Barcat, J.A., Weissenbacher, M.C., Alteration of blood coagulation and complement system in neotropical primates infected with Junin virus. // *J. Med. Virol*. 1983; 12:281–292.
116. Moormann R, van Gennip H, Miedema G, Hulst M, van Rijn P. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. // *Journal of Virology*. 1996; 70:763–770.
117. Mylonakis M, Leontides L, Farmaki R, Kostoulas P, Koutinas A, Christopher M. Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. // *J Vet Diagn Invest*. 2008; 20:774–779.

118. Nafstad H. and Nafstad I. An Electron Microscopic Study of Normal Blood and Bone Marrow in Pigs. // *Path.Vet.* 1968; 5:451-470.
119. Nelsen-Salz B, Eggers H., Zimmermann H. Integrin alpha(v)beta3 (vitronectin receptor) is a candidate receptor for the virulent echovirus 9 strain Barty. // *J Gen Virol.* 1999; 80(9): 2311–2313.
120. Noisakran S, Onlamoon N., Pattanapanyasat K, Hsiao H, Songprakhon P, Angkasekwinai N, Chokeyhaibulkit K, Villinger F, Ansari A, Perngl G. Role of CD61+ cells in thrombocytopenia of dengue patients. // *Int J Hematol.* 2012; 96(5):600–610.
121. Nyström P. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1998; 41, Suppl. A, 1–7
122. Oleaga-Perez A, Perez-Sanchez R, Encinas-Gandes A. Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. // *Vet. Rec.* 1990; 126: 32–37.
123. Osaki T, Ichinose A. Current views of activating and regulatory mechanisms of blood coagulation. // *Nihon Rinsho.* 2014; 72(7):1206-1211.
124. Othman M, Labelle A, Mazzetti I, Elbatarny H, Lillicrap D. Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance. // *Blood.* 2007; 109:2832–2839.
125. Paton D, Greiser-Wilke I. Classical swine fever--an update. // *Res Vet Sci.* 2003; 75(3):169-78.
126. Penrith M, Vosloo W. Review of African swine fever: transmission, spread and control. // *J S Afr Vet Assoc.* 2009; 80:58–62.
127. Pereira J, Soto M, Palomo I, Ocqueteau M, Coetzee L, Astudillo S, Aranda E, Mezzano D. Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs . // *Thromb Haemost.* 2002; 87:905 – 909.

128. Perez J, Bautista M, Rodriguez F, Wilkinson P, Sierra M, Martin de las Mulas J. Double-labelling immunohistochemical study of megakaryocytes in African swine fever. // *Veterinary Record*. 1997; 141(15): 386–390.
129. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. // *Platelets*. 2001; 12:261–273.
130. Ressang A. Studies on the pathogenesis of hog cholera. . Demonstration of hog cholera virus subsequent to oral exposure. // *Zentralbl Veterinarmed*. 1973a; 20(4):256-271.
131. Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, Smit JM. Immature dengue virus: a veiled pathogen? // *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000718.
132. Rodriguez F, Martin de las Mulas J, Herraes P, Sanchez Vizcaino J, Fernandez A. Immunohistopathological study of African swine fever (strain E-75)-infected bone marrow. // *Journal of Comparative Pathology*. 1996b; 114(4):399–406.
133. Rodriguez F, Fernandez A, Martin de las Mulas J, Sierra M, Jover A. African swine fever: morphopathology of a viral haemorrhagic disease. // *Veterinary Record*. 1996a; 139(11):249–254.
134. Røger M, Huitfeldt H, Hovig T. Ultrastructural morphometric analysis of human blood platelets exposed to minimal handling procedures. // *APMIS*. 1992;100(10):922-999.
135. Roivainen M, Hyypiä T, Piirainen L, Kalkkinen N, Stanway G, Hovi T. RGD-dependent entry of coxsackievirus A9 into host cells and its bypass after cleavage of VP1 protein by intestinal proteases. // *J Virol*. 1991; 65: 4735–4740.
136. Rojo G, Garcia-Beato R, Vinuela E, Salas M, Salas J. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. // *Virology*. 1999; 257(2);524–536.
137. Rowlands R, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, Dwarka R, Onashvili T, Albina E, Dixon L. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. // *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1870–1874.
138. Russell K. Schalm's veterinary hematology. – 6th ed.// 2010; Ch 77:577.

139. Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano E, Alera M, Robles A, Estrella B, Kumatori A, Moji K, Alonzo M, Buerano C, Matias R, Morita K, Natividad F, Nagatake T. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. // *Clin Exp Immunol.* 2004; 138: 299–303.
140. Salas M, Kuznar J, Vinuela E. RNA synthesis by African swine fever (ASF) virus. // *African Swine Fever.* // Commission of the European Communities., Report EUR 8466 EN. 1983; 235–239.
141. Salas M, Reycampos J, Almendral J, Talavera A, Vinuela E. Transcription and translation maps of African swine fever virus. // *Virology.* 1986; 152 (1), 228–240.
142. Sánchez-Cordón P, Romanini S, Salguero F, Núñez A, Bautista M, Jover A, Gómez-Villamos J. Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. // *J Comp Pathol.* 2002; 127(4):239-48.
143. Sato M, Mikami O, Kobayashi M, Nakajima Y. Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. // *Vet Microbiol.* 2000; 75(1):1-9.
144. Sierra M, Bernabe A, Mozos E, Mendez A, Jover A. Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. // *Vet Pathol.* 1987; 24:460-462.
145. Sierra M, Carrasco L, Gomez-Viltamandos J, Martin de las Mulas J, Mendez A, Jover A. Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with African swine fever virus of differing virulence. // *J Comp Pathol.* 1990; 102:323-334.
146. Sierra M, Quezada M, Fernandez A, Carrasco L, Gómez-Villamandos JC, Martin de las Mulas J, Sanchez-Vizcaino J. Experimental African swine fever: evidence of the virus in interstitial tissues of kidney. // *Vet Pathol.* 1989; 26:173-176.
147. Slauson D, Sanchez-Vizcaino J. Leukocyte-dependent platelet vasoactive amine release and immune complex deposition in African swine fever. // *Veterinary Pathology.* 1981; 18(6):813–826.

148. Sridharan A, Chen Q, Tang K, Ooi E., Hibberd M, Chen J. Inhibition of Megakaryocyte Development in the Bone Marrow Underlies Dengue Virus-Induced Thrombocytopenia in Humanized Mice. // *Journal of Virology*. 2013; 87, (21):1648–11658.
149. Stier H, Leucht W. Blood sampling from the venous ophthalmic sinus of miniature swine. // *Z Versuchstierkd*. 1980; 22(3):161-4.
150. Stokes K, Granger D. Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction. // *J Physiol*. 2012; 590(5):1023–1034.
151. Sullivan P , Manning K , McDonald T. Association of mean platelet volume and bone marrow megakaryocytopoiesis in thrombocytopenic dogs: 60 cases (1984 – 1993). // *J Am Vet Med Assoc*. 1995; 206:332 – 334.
152. Summerfield A, Hofmann M, McCullough K. Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. // *Vet Immunol Immunopathol*. 1998; 63(3):289-301.
153. Sungaran R, Markovic B, Chong B. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. // *Blood*. 1997; 89(1):101-7.
154. Tabares E, Sanchezbotija C. Synthesis of DNA in cells infected with African swine fever virus. // *Archives of Virology*. 1979; 61(1–2):49–59.
155. Tacke F, Trautwein C, Zhao S, Andreeff M, Manns MP, Ganser A, Schöffski P. Quantification of hepatic thrombopoietin mRNA transcripts in patients with chronic liver diseases shows maintained gene expression in different etiologies of liver cirrhosis. // *Liver*. 2002; 22(3):205-12.
156. The appropriate use of blood. // *World Health Organization Blood Transfusion Safety*. Geneva. 2002
157. Thompson C, Jakubowski J, Quinn P, Deykin D, Valeri R. Platelet Size and Age Determine Platelet Function Independently. // *Blood*. 1984; 63(6):1372-1375.

158. Thon J, Italiano J. Does size matter in platelet production? Preprint //Blood, June 4, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-04-408724.
159. Thorn C. Hematology of the Pig. Schalm's veterinary hematology. – 6th ed.// 2010; Ch 109:845.
160. Tomer A, Harker L, Burstein S. Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. // Blood. 1988; 71 (5):1244-1252.
161. Triantafilou K, Triantafilou M, Takada Y, Fernandez N. Human parechovirus 1 utilizes integrins alphavbeta3 and alphavbeta1 as receptors. // J Virol. 2000; 74:5856–5862.
162. Vallee I, Tait S, Powell P. African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. // J. Virol. 2001; 75:10372–10382.
163. van der Loo B, Kovacevic T, Krieger E, Banyai S, Banyai M, Amann-Vesti B, Jagacic D, Rousson V, Koppensteiner R. Blood fluidity and outcome after femoropopliteal percutaneous transluminal angioplasty (PTA): role of plasma viscosity and low platelet count in predicting restenosis. // Clin Hemorheol Microcirc. 2005; 32(2):159-168.
164. Van Os E, Wu Y, Pouwels J, Ijsseldijk M, Sixma J, Akkerman J, De Groot P, Van Willigen G. Thrombopoietin increases platelet adhesion under flow and decreases rolling. // British Journal of Haematology, 2003; 121:482–490.
165. van Willigen G, Gorter G, Akkerman J. Thrombopoietin increases platelet sensitivity to alpha-thrombin via activation of the ERK2-cPLA2 pathway. // Thrombosis and Haemostasis. 2000; 83:610–616.
166. Villeda C, Williams S, Wilkinson P, Vifiuela E. Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. // Arch Virol. 1993; 133:467-475.
167. Villeda C, Williams S, Wilkinson P, Vifiuela E. Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. // Arch Virol. 1993; 133:467-475.

168. Villeda C, Williams S, Wilkinson P, Vinuela E. Haemostatic abnormalities in African swine fever a comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). // *Archives of Virology*. 1993b; 130(1-2):71–83.
169. Waner T, Leykin I, Shinitsky M, Sharabani E, Buch H, Keysary A, Bark H, Harrus S.. Detection of platelet - bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis* . // *Vet Immunol Immunopathol*. 2000; 77(1-2):145-50.
170. Weinstein R, Stemerman M, MacIntyre D, Steinberg H, Maciag T. The morphological and biochemical characterization of a line of rat promegakaryoblasts. // *Blood*. 1981; 58:110-121.
171. Weksler B. Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 26:13–19.
172. Wengler G., Bradley D, Collett M, Heinz F, Schlesinger R, Strauss J. Flaviviridae. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (Eds.), *Virus Taxonomy*. // *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer Verlag, 1995; 415–427.
173. Wilkinson P., Lawman M., Johnston R. African swine fever in Malta, 1978. // *Veterinary Record*. 1980; 106:94-97.
174. White J , Escolar G . The blood platelet open canalicular system: a two -way street. // *Eur J Cell Biol*. 1991; 56:233–242.
175. White J. Platelets are covercytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. // *Platelets*. 2005; 16:121–131.
176. Wickham T, Mathias P, Cheres D, Nemerow G. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. // *Cell*. 1993; 73:309–319.

177. Winkelmann M, Pfitzer P, Schneider W. Significance of Polyploidy in Megakaryocytes and Other Cells in Health and Tumor Disease. // *Klin Wochenschr.* 1987; 65:1115-1131.
178. Wolber E, Fandrey J, Frackowski U, Jelkmann W. Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. // *Thromb Haemost.* 2001; 86(6):1421-1424.
179. Wolber E, Jelkmann W. Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B. // *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20(5):499-506.
180. World Organisation for Animal Health. WAHID interface. Disease information. 2011.
181. Yáñez R, Rodríguez J, Nogal M, Yuste L, Enríquez C, Rodríguez J, Viñuela E. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. // *Virology.* 1995; 208(1):249-78.
182. Zakaryan H, Cholakyans V, Simonyan L, Misakyan A, Karalova E, Chavushyan A, Karalyan Z. A study of lymphoid organs and serum proinflammatory cytokines in pigs infected with African swine fever virus genotype II. // *Arch Virol.* 2015; 160(6):1407-14.
183. Zapata J, Carrion R, Patterson J, Crasta O, Zhang Y, Mani S, Jett M, Poonia B, Djavani M, White D, Lukashevich I, Salvato M. Transcriptome Analysis of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Exposed to Lassa Virus and to the Attenuated Mopeia/Lassa Reassortant 29 (ML29), a Vaccine Candidate. // *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(9):e2406.
184. Zeigler F, de Sauvage F, Widmer H, Keller G, Donahue C, Schreiber R, Malloy B, Hass P, Eaton D, Matthews W. In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. // *Blood.* 1994; 84:4045-4052.
185. Zeigler Z, Murphy S, Gardner F. Microscopic platelet size and morphology in various hematologic disorders. // *Blood.* 1978; 51:479-486
186. Zeigler Z, Murphy S, Gardner F. Microscopic Platelet Size and Morphology in Various Hematologic Disorders. // *Blood.* 1978; 51(3): 479-486.

187. Zimmerman K . Drug - induced thrombocytopenias . // Schalm ' s Veterinary Hematology. 2000 ; 472 – 477 .
188. Ромейс Б. 1954 Микроскопическая техника // изд. Иностранной литературы. 1954, 648с.
189. Симонян Л, Каралян З. Вирусные геморгические лихорадки свиней и развитие системного воспалительного ответа. Вопросы теоретической и клинической медицины. 2015,18, 3(99):18-20.
190. Струкова С.М. Основы физиологии гемостаза (2-ое изд. переработанное и дополненное)- Москва: Изд.МГУ, 2013.