УДК 608.2:578.8:619:616.98:616-079.4:632.938:57.083.3:577.112

DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-23-28

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННО ВИРУЛЕНТНОГО ВИРУСА АЧС НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-10

А. С. Першин[1], И. В. Шевченко[2], А. С. Иголкин[3], Е. В. Аронова[4], Н. Н. Власова[5]

[1] Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail:* pershin@arriah.ru; *ORCID ID 0000-0002-5099-3050*

[2] Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: shevchenko@arriah.ru*; *ORCID ID 0000-0001-6482-7814*

[3] Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: igolkin_as@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5438-8026*

[4] Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: aronova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-2072-6701*

[5] Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: vlasova_nn@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-8707-7710*

РЕЗЮМЕ

Характерной особенностью вируса африканской чумы свиней является способность избегать иммунного ответа организма хозяина, поражая макрофаги и размножаясь в них. Кроме того, специфические антитела к вирусу африканской чумы свиней его полностью не нейтрализуют. Важными факторами в протекании различных инфекционных вирусных патологий являются цитокины. Вирулентность изолятов вируса африканской чумы свиней может быть обусловлена возможностью регуляции экспрессии цитокинов макрофагами. Так, при сравнении продукции цитокинов макрофагами *in vitro* и *in vivo* установлено, что заражение низковирулентными изолятами вируса приводит к иммунному ответу с преобладанием цитокинов, вовлеченных в клеточный иммунитет, такими как ИНФ-α и ИЛ-12p40, в отличие от заражения высоковирулентными изолятами. Целью данной работы являлось изучение влияния вируса африканской чумы свиней на продукцию ИЛ-10 – плейотропного цитокина, ингибирующего синтез цитокинов и проявляющего сильный противовоспалительный эффект. Для этого проводили экспериментальное заражение 12 поросят адаптированным к перевиваемой клеточной культуре изолятом вируса африканской чумы свиней Vero25 внутримышечно в дозе 10 ГАдЕ/гол. с последующим контрольным заражением выживших животных референтным изолятом вируса Arm 07 в дозе 1000 ГАдЕ/гол. В течение всего опыта проводили термометрию и отбор проб крови для получения сыворотки. Определение содержания ИЛ-10 в сыворотке крови проводили с использованием тест-систем Invitrogen (Thermo Fisher, США). У погибших животных после заражения умеренно вирулентным вирусом в сыворотке крови наблюдался более высокий уровень ИЛ-10 (15,8–173 пг/мл) по сравнению с выжившими поросятами (4–5 пг/мл). Зависимости скорости появления специфических антител от уровня ИЛ-10 в сыворотке крови не установлено. Заметного влияния уровня содержания ИЛ-10 в сыворотке крови до заражения на выживаемость животных не установлено. Для установления причинно-следственной связи необходимы дальнейшие исследования, включающие изучение экспрессии различных цитокинов при заражении как низко-, так и высоковирулентными изолятами вируса.

Ключевые слова: африканская чума свиней, вирулентность, иммунология, интерлейкин-10, биопроба

UDC 608.2:578.8:619:616.98:616-079.4:632.938:57.083.3:577.112

EFFECTS OF MODERATELY VIRULENT AFRICAN SWINE FEVER VIRUS ON INTERLEUKIN-10 PRODUCTION

A. S. Pershin[1], I. V. Shevchenko[2], A. S. Igolkin[3], Ye. V. Aronova[4], N. N. Vlasova[5]

[1] Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: pershin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5099-3050*

[2] Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: shevchenko@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-6482-7814*

[3] Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: igolkin_as@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5438-8026*

[4] Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: aronova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-2072-6701*

[5] Senior Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, *e-mail: vlasova_nn@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-8707-7710*

SUMMARY

A characteristic feature of African swine fever virus (ASFV) is the ability to escape from host immune response, affecting macrophages and replicating in them. Besides, ASFV - specific antibodies do not completely neutralize the virus. Cytokines are important factors for various viral infection pathologies. The virulence of ASFV isolates may depend on the capacity to regulate cytokine expression by macrophages. Thus, when comparing *in vitro* and *in vivo* cytokine production by macrophages, it was established that infection with low virulent virus isolates leads to an immune response with a predominance of cytokines involved in cellular immunity, such as INF-α and IL-12p40, as compared with infection with highly virulent isolates. The aim of this paper was to study the effect of African swine fever virus on the production of IL-10, a pleiotropic cytokine that inhibits synthesis of cytokines and shows a strong anti-inflammatory effect. For this, 12 piglets were experimentally infected intramuscularly with a continuous cell culture-adapted ASFV isolate Vero25 at a dose of 10 HAdU per animal followed by control infection of surviving animals with the reference virus isolate Arm 07 at a dose of 1,000 HAdU per animal. Temperature measurements were taken and blood sampling to obtain serum was conducted during the experiment. IL-10 amount in blood sera was determined using Invitrogen test systems (Thermo Fisher, USA). A higher IL-10 level (15.8–173 pg/ml) was observed in blood sera of dead animals infected with a moderately virulent virus, as compared with surviving pigs (4–5 pg/ml). No correlation between the speed of appearance of specific antibodies and IL-10 serum levels has been established. No noticeable effect of the IL-10 serum level prior to infection on the survival rate of animals has been observed. Further studies are needed to establish a causal relationship, including study of the expression of various cytokines during infection with both low- and highly virulent virus isolates.

Key words: African swine fever, virulence, immunology, interleukin-10, bioassay.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная вирусная болезнь, поражающая домашних свиней и диких кабанов, характеризующаяся проявлениями геморрагической лихорадки. АЧС у животных может протекать в формах от сверхострой до инаппарантной. Летальность при заражении высоковирулентными изолятами достигает 100%. На сегодняшний день эффективных мер лечения и специфической профилактики АЧС не существует [6, 10, 12, 14].

Россия стационарно неблагополучна по АЧС с момента заноса возбудителя на ее территорию в 2007 г. Основной экономический ущерб от болезни складывается из затрат на вынужденное уничтожение животных и ликвидацию вспышек, а также затрат, к которым приводят ограничения, накладываемые на внутреннюю и международную торговлю. Отсутствие доступных для использования в свиноводстве специфических средств профилактики и лечения болезни указывает на необходимость разработки данных препаратов. Для этого требуется расширенное изучение факторов, влияющих на иммунный ответ. Регуляция иммунного ответа цитокинами играет важную роль в протекании различных патологических процессов при вирусной инфекции [28]. Несбалансированный иммунный ответ и избыточная продукция провоспалительных цитокинов приводит к повреждению тканей организма хозяина. Это следует учитывать при вакцинации животных аттенуированными вирусами.

Одной из стратегий макроорганизма, направленных на предотвращение таких последствий иммунного ответа, является высвобождение иммуносупрессивного цитокина – интерлейкина-10 (ИЛ-10) [22]. Интерлейкин-10 – это плейотропный цитокин, являющийся одним из самых важных цитокинов, регулирующим иммунитет и впервые охарактеризованным в качестве фактора, ингибирующего синтез цитокинов. Результатом действия ИЛ-10 является сильный противовоспалительный эффект.

Считается, что программирование фенотипа макрофагов во время иммунного ответа обуславливается типом доминирующих цитокинов. При стимуляции гамма-интерфероном (ИНФ-γ) и липополисахаридами поляризуются макрофаги типа М1, которые запускают Th1-клеточный ответ и помогают в защите от внутриклеточных патогенов, уничтожая пораженные клетки.

В противоположность этому активация через ИЛ-4 или ИЛ-13 индуцирует макрофаги типа М2, которые продуцируют высокий уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и связаны с механизмами иммуносупрессии и заживления ран [25]. Помимо макрофагов, ИЛ-10 продуцирует Т- и В-клетки, а также тучные клетки, кератиноциты и некоторые опухолевые клеточные линии.

Основной эффект ИЛ-10 заключается в ингибировании активности НК-клеток (натуральных киллеров) и Т-клеток, продукции цитокинов клетками Th1 (Т-хелперами) и мононуклеарными клетками периферической крови, а также влиянии на активность макрофагов. В макрофагах ИЛ-10 ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α) и ИЛ-6 [17, 29]. С другой стороны, ИЛ-10 оказывает иммуностимулирующий эффект на В-клетки. Добавление ИЛ-10 к В-лимфоцитам приводит к их пролиферации и высокому уровню продукции иммуноглобулинов в результате трансформации В-клеток в плазматические клетки [16]. Иммуносупрессивные функции ИЛ-10 свидетельствуют о его возможном клиническом использовании для подавления отторжения трансплантированных органов. Кроме того, ИЛ-10 может ингибировать индуцированную антигеном продукцию ИНФ-γ НК-клетками.

В исследованиях показано, что блокада сигнального пути ИЛ-10 во время вакцинации увеличивает индукцию цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа [23]. Также показано, что у трансгенных мышей с дефицитом ИЛ-10 происходит избыточная продукция воспалительных цитокинов, что приводит к хроническому воспалению [5, 18, 21, 26, 32].

Регуляция продукции цитокинов и иммунного ответа при заражении вариантами вируса АЧС различной вирулентности изучена не полностью. При сравнении продукции цитокинов макрофагами *in vitro* и *in vivo* установлено, что заражение низковирулентными изолятами вируса приводит к иммунному ответу с преобладанием цитокинов, вовлеченных в клеточный иммунитет, такими как ИНФ-α и ИЛ-12p40, в отличие от заражения высоковирулентными изолятами [30]. Другие исследования указывают на то, что заметной разницы в выработке гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12 и ФНО-α моноцитами и макрофагами, инфицированными как авирулентным, так и вирулентным штаммом, не обнаружено [9].

S. Gil и соавт. показали, что заражение низковирулентными изолятами вируса АЧС сопровождается значительным увеличением экспрессии и более ранними сроками продукции провоспалительных и индуцирующих клеточный иммунный ответ цитокинов. Этого не происходит при заражении высоковирулентными изолятами. Таким образом, вирулентность изолятов вируса АЧС может обуславливаться возможностью регуляции экспрессии цитокинов макрофагами [13].

Целью данной работы явилось изучение влияния вируса АЧС на продукцию ИЛ-10 в организме свиньи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное заражение проводили на поросятах массой тела 15–20 кг, полученных из благополучного по инфекционным болезням хозяйства Владимирской области. Животных содержали в изолированном боксе виварного комплекса ФГБУ «ВНИИЗЖ», отвечающего требованиям работы с ПБА II группы патогенности (BSL-3). В течение 9-суточного карантина исследовали сыворотку крови животных для подтверждения серонегативного статуса к возбудителям основных инфекционных болезней свиней. Все эксперименты на животных проводили согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2012 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Заражение проводили адаптированным к перевиваемой клеточной культуре изолятом вируса АЧС Vero25 внутримышечно в дозе 10 ГАдЕ/гол. Вируссодержащей суспензией заражали 12 поросят, еще 2 головы содержали совместно с инфицированными поросятами в качестве контроля контагиозности. Контрольное заражение проводили референтным изолятом АЧС Arm 07 в дозе 1000 ГАдЕ/гол.

Ежедневно проводили термометрию и наблюдение за животными. В разные сроки после заражения

Таблица
Результаты обнаружения генома вируса АЧС и противовирусных антител

Номер животного	Дни после заражения															
	3		7		10		14		21		28		42 (12 КЗ)		50 (20 КЗ)	
	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА
1К	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–				
2К	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–				
3	±	–	+	–	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+	±	+
4	–	–	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
5	–	–	+	–	+	–										
6	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+
7	–	–	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
8	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+
9	–	–	+	–	+	–										
10	–	–	±	–	+	–	–	+	±	+	–	+	–	+	±	+
11	±	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+
12	–	–	+	–	+	–	+	–								
13	±	–	+	–	+	–	+	+								
14	±	–	+	–	+	+	+	+								

КЗ – дней после контрольного заражения;
ПЦР: «+» – пороговый цикл (Ct) соответствует положительному результату;
«–» – Ct соответствует отрицательному результату; «±» – Ct соответствует сомнительному результату;
ИФА: «+» – процент позитивности соответствует положительному результату;
«–» – процент позитивности соответствует отрицательному результату.

у поросят отбирали пробы крови для получения сыворотки. Сыворотки отделяли из цельной крови через 18 ч после отбора и замораживали до проведения исследования.

Для определения содержания ИЛ-10 в сыворотке крови использовали тест-систему Invitrogen (Thermo Fisher, США) согласно инструкции производителя. Аналитическая чувствительность тест-системы – от 3 пг/мл.

Для определения способности изолята вируса АЧС вызвать выработку антител и сроков их обнаружения проводили иммуноферментный анализ (ИФА) с помощью набора Ingezim PPA Compac K3 (Ingenasa, Испания) в соответствии с инструкцией производителя.

Эффективность заражения по наличию генетического материала вируса АЧС в крови определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для постановки реакции использовали «Тест-систему для диагностики африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На 8–15-е сутки после заражения пять из двенадцати зараженных животных пали с проявлением клинической и патологоанатомической картины АЧС. Семь зараженных животных выжило, при этом у некоторых наблюдалось только незначительное повышение температуры, что указывает на умеренно вирулентные свойства изолята. Оба контрольных поросенка выжили без проявления клинических признаков АЧС, что говорит об отсутствии контактной передачи им вирулентного вируса, что подтверждено результатами ПЦР (табл.).

Контрольное заражение семи выживших и двух контрольных поросят провели через 30 суток после начала опыта. На 6–7-е сутки после заражения контрольные поросята пали с признаками, характерными для АЧС, что говорит об отсутствии у них протективного иммунитета.

До заражения животные имели различный уровень содержания ИЛ-10 в сыворотке крови. У трех из пяти павших животных уровень исследуемого цитокина находился на умеренно высоком уровне – 15–25 пг/мл (рис.). У двух павших животных его уровень до заражения составлял 5–8 пг/мл, что не позволяет подтвердить вывод J. Post и соавт. [20] о влиянии содержания высокого уровня ИЛ-10 до заражения на выживаемость. Однако при делении животных на группы, включающие погибших и выживших, прослеживается зависимость между уровнем содержания ИЛ-10 в сыворотке крови после заражения и гибелью животных. У выживших животных уровень содержания ИЛ-10 находился на уровне нижней границы чувствительности используемой тест-системы (4–5 пг/мл). У всех пяти павших животных в пробах, полученных перед гибелью, обнаружено более высокое содержание ИЛ-10 (15,8–173 пг/мл).

Уровень ИЛ-10 у одного контрольного животного незначительно повысился на 14-е сутки после начала опыта (29,8 пг/мл), достигнув к 28-м суткам значения 163,4 пг/мл. При этом геном вируса АЧС, а также

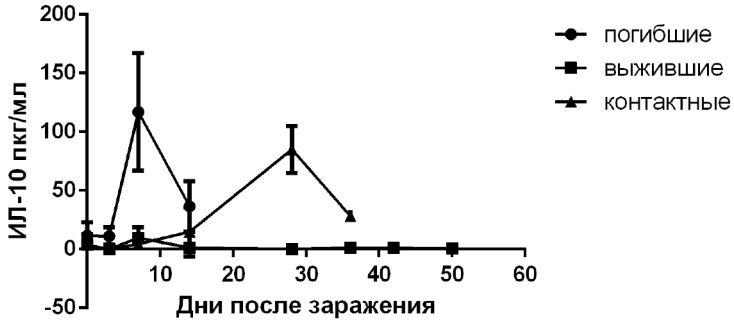

Рис. Динамика выявления ИЛ-10 в сыворотке крови поросят

антитела к нему на протяжении всего эксперимента до момента контрольного заражения в крови поросят отсутствовали, что указывает на влияние других факторов, например, иной инфекционной патологии.

Второе контрольное животное до контрольного заражения имело низкий уровень ИЛ-10 (7,1 пг/мл), который после заражения повысился, достигнув перед гибелью значения 28,3 пг/мл. Животные погибли с клиническими признаками и патологоанатомическими изменениями, характерными для АЧС.

Среди многообразия путей воздействия ИЛ-10 на организм можно предположить, что влияние на патогенез АЧС в основном оказывают:

Ингибирование продукции ФНО-α моноцитами и макрофагами. Начало клинической картины АЧС сопровождает провоспалительная активация моноцитов и макрофагов. Активированные моноциты и макрофаги секретируют широкий спектр медиаторов, включая провоспалительные цитокины, среди которых одним из важнейших является ФНО-α [2, 19].

ФНО-α может индуцировать васкулярные изменения, включающие вазодилатацию и увеличение проницаемости сосудов, а также изменять коагуляционный статус васкулярного эндотелия. Увеличение продукции ФНО-α совместно с ИЛ-1α, ИЛ-1β и IL-6 – один из механизмов, участвующих в развитии лихорадки, поражении сосудов и изменениях в лимфоидных структурах [8].

Различными исследователями установлено, что инфекция АЧС ассоциирована с продукцией ФНО-α, и, вероятно, данный цитокин регулирует главные клинические проявления болезни. Инфицирование свиных макрофагов вирусом АЧС приводит к увеличению экспрессии ФНО-α *in vitro*. Кроме того, высокий уровень ФНО-α обнаруживается в сыворотке крови инфицированных вирусом АЧС животных. При заражении высоковирулентным вирусом значительная продукция ФНО-α наблюдается уже на ранних сроках [27].

Кроме того, при АЧС поражаются легочные внутрисосудистые макрофаги. Их инфицирование приводит к активации и экспрессии ИЛ-1α и ФНО-α. Данные цитокины участвуют в механизме развития интерстициального отека и формировании микротромбов в капиллярах альвеолярных перегородок, это играет ведущую роль в появлении поражений легких [2, 7, 31].

Повышение уровня ИЛ-10 на конечной стадии острой инфекции АЧС является результатом включения противовоспалительного ответа [27]. Ингибирующее действие ИЛ-10 на ФНО-α и ИЛ-1 критично для его противовоспалительной активности, так как эти цитокины имеют синергетическое действие на воспаление, усиливая его через индукцию простагландинов, фактора активации тромбоцитов и других цитокинов [4]. ИЛ-10 не только индуцирует ингибирование этих эффекторов, но и усиливает экспрессию их антагонистов [22].

Геморрагический синдром при АЧС наносит серьезные поражения организму [1]. Ингибирование ФНО-α на поздних стадиях острой АЧС является фактором, который должен приводить к более благоприятному прогнозу, как показано J. Post и соавт. [20]. Однако в данном эксперименте высокий уровень ИЛ-10 имели все павшие животные, вероятно, из-за способности ИЛ-10 оказывать другие эффекты на иммунную систему.

Участие ИЛ-10 в регуляции пролиферации и дифференциации В-клеток, что приводит к более высокому уровню продукции иммуноглобулинов.

Высокий уровень иммуноглобулинов в сыворотке приводит к высокой частоте связывания рецепторов цитотоксических клеток с Fc-фрагментами антител, адсорбированных на поверхности инфицированных клеток.

Ранее было продемонстрировано, что инфицирование вирусом АЧС может приводить к чрезмерной стимуляции В-лимфоцитов как *in vitro*, так и *in vivo* [3, 33], что в отсутствии эффекта нейтрализации вируса антителами способно усилить диссеминацию вируса в организме и привести к развитию антителозависимой клеточной цитотоксичности. Так, в отдельных случаях у животных, получавших специфические антитела к вирусу АЧС до заражения, отмечают более стремительное развитие клинических признаков болезни, а также более выраженные патологоанатомические изменения, так как антитела могут оказывать потенцирующий эффект на проникновение вируса в целевые клетки макрофагального ряда [1]. Таким образом, по-видимому, антитела могут ускорять гибель либо выздоровление животного, в зависимости от способности других составляющих иммунитета эффективно бороться с АЧС, сами не приводя к нейтрализации вируса. В данном эксперименте зависимости скорости появления специфических антител от уровня ИЛ-10 в сыворотке крови не установлено.

Ингибирование активации и эффекторной функции Т-клеток [22]. Большую роль в защите от АЧС у переболевших животных отводят клеточному иммунитету. Результаты экспериментов с «обеднением» CD8+ лимфоцитов иммунных свиней моноклональными антителами подтверждают важную роль цитотоксических лимфоцитов в защите против вируса АЧС [17]. ИЛ-10 ингибирует активацию Th1 и НК-клеток [13]. Таким образом, индукция ИЛ-10 может играть существенную роль в патогенезе АЧС и наступлении гибели животного.

В опытах J. Post и соавт. [20] выжившие после заражения вирусом АЧС животные имели значительно более высокий уровень ИЛ-10 в сыворотке крови. Показано, что возраст влиял на наличие ФНО-α, ИЛ-12 и ИЛ-10 в начале эксперимента. У взрослых свиней (18-недельных по сравнению с 12-недельными) перед проведением опыта уровень данных цитокинов был более высоким. При распределении групп по летальности отличия были только в ИЛ-10, при этом его высокие уровни были у выживших животных. Авторы предполагают, что это обусловлено способностью ИЛ-10 предотвращать неконтролируемую продукцию провоспалительных цитокинов и повреждение тканей, что дает возможность Т-клеткам эффективно бороться с вирусом. При

этом у выживших животных обнаруживалось высокое количество γδ-Т-клеток и активированных НК-клеток, что может указывать на действие ИЛ-10 [15].

Высокое количество цитотоксичных клеток у выживших животных может быть не результатом действия ИЛ-10, а независимой от этого причиной, особенно учитывая ингибирующий эффект ИЛ-10 на Т-клетки. Высокое содержание ИЛ-10 у павших животных при проведении эксперимента, описанного в данной работе, может быть связано как с высоким уровнем репликации вируса, что приводит к заражению и активации большого количества продуцирующих ИЛ-10 макрофагов, так и с направлением ИЛ-10 на переключение формы инфекции с острой в подострую [27], однако отсутствие эффективных против АЧС звеньев иммунитета не позволяло животным выжить.

Схожую картину наблюдают при инфицировании человека вирусом Эбола. Имеется четкое различие в экспрессии цитокинов у выживших и погибших пациентов. Наличие ИЛ-10 и высоких уровней неоптерина и рецептора А ИЛ-1 после наступления клинических признаков свидетельствует о фатальной инфекции, в то время как присутствие ИЛ-1β и возрастающие концентрации ИЛ-6 в плазме в течение фазы клинического проявления болезни являются маркерами нефатальной инфекции [11, 24].

Кроме того, различия в зависимом от ИЛ-10 развитии болезни могут быть вызваны полиморфизмом кодирующих генов [25] либо различиями в вирулентности исследуемых изолятов.

Все это указывает на необходимость дальнейшего изучения регуляции воспаления (экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов) при различных формах АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У погибших после заражения умеренно вирулентным вирусом АЧС животных наблюдался более высокий уровень ИЛ-10 в сыворотке крови (15,8–173 пг/мл) по сравнению с выжившими поросятами (4–5 пг/мл). Для установления причинно-следственной связи необходимы дальнейшие исследования, включающие изучение экспрессии различных цитокинов при заражении как низко-, так и высоковирулентными изолятами вируса.

Контрольное заражение не влияет на уровень ИЛ-10 в сыворотке крови, вероятно, в результате того, что заболевание протекает без сильного воспаления, которое организму необходимо было бы регулировать, как это происходит в случае первичного иммунного ответа.

Заметного влияния уровня содержания ИЛ-10 в сыворотке крови до заражения на выживаемость животных не установлено.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние пассивной иммунизации на клинические и патологоанатомические изменения у свиней, зараженных изолятом Мартинс-Крым 01/16 вируса АЧС / А. С. Першин, С. Г. Ремыга, И. В. Шевченко [и др.] // Ветеринария. – 2018. – № 1. – С. 25–31.

2. African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis / M. Gómez del Moral, E. Ortuño, P. Fernández-Zapatero [et al.] // J. Virol. – 1999. – Vol. 73 (3). – P. 2173–2180; PMCID: PMC104462.

3. African swine fever virus: a B cell-mitogenic virus *in vivo* and *in vitro* / H. Takamatsu, M. S. Denyer, C. Oura [et al.] // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80 (Pt. 6). – P. 1453–1461; DOI: 10.1099/0022-1317-80-6-1453.

4. African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages / L. Carrasco, A. Núñez, F. J. Salguero [et al.] // J. Comp. Pathol. – 2002. – Vol. 126 (2–3). – P. 194–201; DOI: 10.1053/jcpa.2001.0543.

5. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter / R. Lang, R. L. Rutschman, D. R. Greaves, P. J. Murray // J. Immunol. – 2002. – Vol. 168 (7). – P. 3402–3411; DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3402.

6. Biological properties of African swine fever virus Odintsovo 02/14 isolate and its genome analysis / A. A. Elsukova, I. V. Shevchenko, A. A. Varentsova [et al.] // Int. J. Environ. Agricult. Res. – 2017. – Vol. 3 (10). – P. 26–37; DOI: 10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-OCT-2017-15.

7. Blome S., Gabriel C., Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar // Virus Res. – 2013. – Vol. 173 (1). – P. 122–130; DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.026.

8. Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines / F. J. Salguero, E. Ruiz-Villamor, M. J. Bautista [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2002. – Vol. 90 (1–2). – P. 11–22; DOI: 10.1016/S0165-2427(02)00225-8.

9. Characterization of the interaction of African swine fever virus with monocytes and derived macrophage subsets / G. Franzoni, S. P. Graham, S. D. Giudici [et al.] // Vet. Microbiol. – 2017. – Vol. 198. – P. 88–98; DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.12.010.

10. Comparative analysis of clinical and biological characteristics of African swine fever virus isolates from 2013 year Russian Federation / N. N. Vlasova, A. A. Varentsova, I. V. Shevchenko [et al.] // British Microbiol. Res. J. – 2015. – Vol. 5 (3). – P. 203–215; DOI: 10.9734/bmrj/2015/12941.

11. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome of Ebola virus-infected patients / S. Baize, E. M. Leroy, M. C. Georges-Courbot [et al.] // Nat. Med. – 1999. – Vol. 5 (4). – P. 423–426; DOI: 10.1038/7422.

12. Evolution of African swine fever virus genes related to evasion of host immune response / M. Frączyk, G. Woźniakowski, A. Kowalczyk [et al.] // Vet. Microbiol. – 2016. – Vol. 193. – P. 133–144; DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.08.018.

13. Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected *in vitro* with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence / S. Gil, M. Spagnuolo-Weaver, A. Canals [et al.] // Arch. Virol. – 2003. – Vol. 148 (11). – P. 2077–2097; DOI: 10.1007/s00705-003-0182-x.

14. Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, Eastern and Central Europe / C. Gallardo, J. Fernández-Pinero, V. Pelayo [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 20 (9). – P. 1544–1547; DOI: 10.3201/eid2009.140554.

15. IL-10 enhances expression of the IL-2 receptor alpha chain on T cells / S. B. Cohen, P. D. Katsikis, M. Feldmann, M. Londei // Immunology. – 1994. – Vol. 83 (3). – P. 329–332; PMCID: PMC1415032.

16. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always / P. Conti, D. Kempuraj, K. Kandere [et al.] // Immunol Lett. – 2003. – Vol. 86 (2). – P. 123–129; DOI: 10.1016/s0165-2478(03)00002-6.

17. *In vivo* depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus / C. A. Oura, M. S. Denyer, H. Takamatsu, R. M. Parkhouse // J. Gen. Virol. – 2005. – Vol. 86 (Pt. 9). – P. 2445–2450; DOI: 10.1099/vir.0.81038-0.

18. Induction of IL-10 and inhibition of experimental arthritis are specific features of microbial heat shock proteins that are absent for other evolutionarily conserved immunodominant proteins / B. Prakken, U. Wendling, R. van der Zee [et al.] // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167 (8). – P. 4147–4153; DOI: 10.4049/jimmunol.167.8.4147.

19. Inflammatory cytokines in animal health and disease / M. Murtaugh, M. J. Baarsch, Y. Zhou [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1996. – Vol. 54 (1–4). – P. 45–55; DOI: 10.1016/S0165-2427(96)05698-X.

20. Influence of age and dose of African swine fever virus infections on clinical outcome and blood parameters in pigs / J. Post, E. Weesendorp, M. Montoya, W. L. Loeffen // Viral Immunol. – 2017. – Vol. 30 (1). – P. 58–69; DOI: 10.1089/vim.2016.0121.

21. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms / P. Wang, P. Wu, M. I. Siegel [et al.] // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270 (16). – P. 9558–9563; DOI: 10.1074/jbc.270.16.9558.

22. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor / K. W. Moore, R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, A. O'Garra // Ann. Rev. Immunol. – 2001. – Vol. 19. – P. 683–765; DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.

23. Manipulating IL-10 signalling blockade for better immunotherapy / G. Ni, T. Wang, S. Walton [et al.] // Cell. Immunol. – 2015. – Vol. 293 (2). – P. 126–129; DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.12.012.

24. Markedly elevated levels of interferon (IFN)-γ, IFN-α, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-α associated with fatal Ebola virus infection / F. Villinger, P. E. Rollin, S. S. Brar [et al.] // J. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 179 (Suppl. 1). – P. 188–191; DOI: 10.1086/514283.

25. Molecular characterization and SNP development for the porcine IL6 and IL10 genes / E. Daniłowicz, M. Akouchekian, C. Drogemuller [et al.] // Anim. Biotechnol. – 2008. – Vol. 19 (3). – P. 159–165; DOI: 10.1080/10495390802088621.

26. Mosser D. M. The many faces of macrophage activation // J. Leukoc. Biol. – 2003. – Vol. 73 (2). – P. 209–212; DOI: 10.1189/jlb.0602325.

27. Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage / J. C. Gómez-Villamandos, M. J. Bautista, P. J. Sánchez-Cordón, L. Carrasco // Virus. Res. – 2013. – Vol. 173 (1). – P. 140–149; DOI: 10.1016/j.virusres.2013.01.017.

28. Peters C. J. Viral hemorrhagic fevers // Viral Pathogenesis / ed. N. Nathanson [et al.]. – Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. – P. 779–799.

29. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions / S. Corinti, C. Albanesi, A. la Sala [et al.] // J. Immunol. – 2001. – Vol. 166 (7). – P. 4312–4318; DOI: 10.4049/jimmunol.166.7.4312.

30. The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFNα, TNFα and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60 / S. Gil, N. Sepúlveda, E. Albina [et al.] // Arch. Virol. – 2008. – Vol. 153 (10). – P. 1845–1854; DOI: 10.1007/s00705-008-0196-5.

31. The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African swine fever / L. Carrasco, F. C. de Lara, J. C. Gómez-Villamandos [et al.] // Res. Vet. Sci. – 1996. – Vol. 61 (3). – P. 193–198; PMID: 8938846.

32. Vaccination against tuberculosis: how can we better BCG? / J. M. Pitt, S. Blankley, H. McShane, A. O'Garra // Microb. Pathog. – 2013. – Vol. 58. – P. 2–16; DOI: 10.1016/j.micpath.2012.12.002.

33. Wardley R. C. Effect of African swine fever on lymphocyte mitogenesis // Immunology. – 1982. – Vol. 46 (1). – P. 215–220; PMCID: PMC1555335.

REFERENCES

1. Influence of passive immunization on clinical and pathological features of pig infection with isolate Martins-Crimea 01/16 ASFV [Vliyanie passivnoj immunizacii na klinicheskie i patologoanatomicheskie izmeneniya u svinej, zarazhennyh izolyatom Martins-Krym 01/16 virusa ACHS]. A. S. Pershin, S. G. Remyga, I. V. Shevchenko [et al.]. *Veterinaria*. 2018; 1: 2531 (in Russian).

2. African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. M. Gómez del Moral, E. Ortuño, P. Fernández-Zapatero [et al.]. *J. Virol.* 1999; 73 (3): 2173–2180; PMCID: PMC104462.

3. African swine fever virus: a B cell-mitogenic virus *in vivo* and *in vitro*. H. Takamatsu, M. S. Denyer, C. Oura [et al.]. *J. Gen. Virol*. 1999; 80 (Pt. 6): 1453–1461; DOI: 10.1099/0022-1317-80-6-1453.

4. African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages. L. Carrasco, A. Núñez, F. J. Salguero [et al.]. *J. Comp. Pathol*. 2002; 126 (2–3): 194–201; DOI: 10.1053/jcpa.2001.0543.

5. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. R. Lang, R. L. Rutschman, D. R. Greaves, P. J. Murray. *J. Immunol.* 2002; 168 (7): 3402–3411; DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3402.

6. Biological properties of African swine fever virus Odintsovo 02/14 isolate and its genome analysis. A. A. Elsukova, I. V. Shevchenko, A. A. Varentsova [et al.]. *Int. J. Environ. Agricult. Res.* 2017; 3 (10): 26–37; DOI: 10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-OCT-2017-15.

7. Blome S., Gabriel C., Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res.* 2013; 173 (1): 122–130; DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.026.

8. Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. F. J. Salguero, E. Ruiz-Villamor, M. J. Bautista [et al.]. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 90 (1–2): 11–22; DOI: 10.1016/S0165-2427(02)00225-8.

9. Characterization of the interaction of African swine fever virus with monocytes and derived macrophage subsets. G. Franzoni, S. P. Graham, S. D. Giudici [et al.]. *Vet. Microbiol.* 2017; 198: 88–98; DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.12.010.

10. Comparative analysis of clinical and biological characteristics of African swine fever virus isolates from 2013 year Russian Federation. N. N. Vlasova, A. A. Varentsova, I. V. Shevchenko [et al.]. *British Microbiol. Res. J.* 2015; 5 (3): 203–215; DOI: 10.9734/bmrj/2015/12941.

11. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome of Ebola virus-infected patients. S. Baize, E. M. Leroy, M. C. Georges-Courbot [et al.]. *Nat. Med.* 1999; 5 (4): 423–426; DOI: 10.1038/7422.

12. Evolution of African swine fever virus genes related to evasion of host immune response. M. Frączyk, G. Woźniakowski, A. Kowalczyk [et al.]. *Vet. Microbiol*. 2016; 193: 133–144; DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.08.018.

13. Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. S. Gil, M. Spagnuolo-Weaver, A. Canals [et al.]. *Arch. Virol*. 2003; 148 (11): 2077–2097; DOI: 10.1007/s00705-003-0182-x.

14. Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, Eastern and Central Europe. C. Gallardo, J. Fernández-Pinero, V. Pelayo [et al.]. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (9): 1544–1547; DOI: 10.3201/eid2009.140554.

15. IL-10 enhances expression of the IL-2 receptor alpha chain on T cells. S. B. Cohen, P. D. Katsikis, M. Feldmann, M. Londei. *Immunology*. 1994; 83 (3): 329–332; PMCID: PMC1415032.

16. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. P. Conti, D. Kempuraj, K. Kandere [et al.]. *Immunol Lett*. 2003; 86 (2): 123–129; DOI: 10.1016/s0165-2478(03)00002-6.

17. *In vivo* depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. C. A. Oura, M. S. Denyer, H. Takamatsu, R. M. Parkhouse. *J. Gen. Virol*. 2005; 86 (Pt. 9): 2445–2450; DOI: 10.1099/vir.0.81038-0.

18. Induction of IL-10 and inhibition of experimental arthritis are specific features of microbial heat shock proteins that are absent for other evolutionarily conserved immunodominant proteins. B. Prakken, U. Wendling, R. van der Zee [et al.]. *J. Immunol*. 2001; 167 (8): 4147–4153; DOI: 10.4049/jimmunol.167.8.4147.

19. Inflammatory cytokines in animal health and disease. M. Murtaugh, M. J. Baarsch, Y. Zhou [et al.]. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 1996; 54 (1–4): 45–55; DOI: 10.1016/S0165-2427(96)05698-X.

20. Influence of age and dose of African swine fever virus infections on clinical outcome and blood parameters in pigs. J. Post, E. Weesendorp, M. Montoya, W. L. Loeffen. *Viral Immunol*. 2017; 30 (1): 58–69; DOI: 10.1089/vim.2016.0121.

21. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. P. Wang, P. Wu, M. I. Siegel [et al.]. *J. Biol. Chem*. 1995; 270 (16): 9558–9563; DOI: 10.1074/jbc.270.16.9558.

22. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. K. W. Moore, R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, A. O'Garra. *Ann. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683–765; DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.

23. Manipulating IL-10 signalling blockade for better immunotherapy. G. Ni, T. Wang, S. Walton [et al.]. *Cell. Immunol*. 2015; 293 (2): 126–129; DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.12.012.

24. Markedly elevated levels of interferon (IFN)-γ, IFN-α, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-α associated with fatal Ebola virus infection. F. Villinger, P. E. Rollin, S. S. Brar [et al.]. *J. Infect. Dis*. 1999; 179 (Suppl. 1): 188–191; DOI: 10.1086/514283.

25. Molecular characterization and SNP development for the porcine IL6 and IL10 genes. E. Daniłowicz, M. Akouchekian, C. Drogemuller [et al.]. *Anim. Biotechnol*. 2008; 19 (3): 159–165; DOI: 10.1080/10495390802088621.

26. Mosser D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 73 (2): 209–212; DOI: 10.1189/jlb.0602325.

27. Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage. J. C. Gómez-Villamandos, M. J. Bautista, P. J. Sánchez-Cordón, L. Carrasco. *Virus. Res*. 2013; 173 (1): 140–149; DOI: 10.1016/j.virusres.2013.01.017.

28. Peters C. J. Viral hemorrhagic fevers. *Viral Pathogenesis.* ed. N. Nathanson [et al.]. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; 779–799.

29. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. S. Corinti, C. Albanesi, A. la Sala [et al.]. *J. Immunol*. 2001; 166 (7): 4312–4318; DOI: 10.4049/jimmunol.166.7.4312.

30. The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFNα, TNFα and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60. S. Gil, N. Sepúlveda, E. Albina [et al.]. *Arch. Virol*. 2008; 153 (10): 1845–1854; DOI: 10.1007/s00705-008-0196-5.

31. The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African swine fever. L. Carrasco, F. C. de Lara, J. C. Gómez-Villamandos [et al.]. *Res. Vet. Sci*. 1996; 61 (3): 193–198; PMID: 8938846.

32. Vaccination against tuberculosis: how can we better BCG? J. M. Pitt, S. Blankley, H. McShane, A. O'Garra. *Microb. Pathog*. 2013; 58: 2–16; DOI: 10.1016/j.micpath.2012.12.002.

33. Wardley R. C. Effect of African swine fever on lymphocyte mitogenesis. *Immunology*. 1982; 46 (1): 215–220; PMCID: PMC1555335.

Поступила 02.08.19
Принята в печать 23.08.19