

На правах рукописи

ЛЫСЕНКОВА Антонина Сергеевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО
БАРЬЕРА ЛЕГКИХ У СОБАК
ПРИ ДИРОФИЛЯРИОЗЕ**

**06.02.01 - диагностика болезней и терапия животных,
патология, онкология и морфология животных**

Автореферат
**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Ставрополь – 2013

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Новочеркасск)

Научный руководитель: **Ермаков Алексей Михайлович**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Квочко Андрей Николаевич**
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», заведующий кафедрой физиологии, хирургии и акушерства

Дерезина Татьяна Николаевна
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Донской государственный аграрный университет», заведующая кафедрой внутренних незаразных болезней, патофизиологии, клинической диагностики, фармакологии и токсикологии

Ведущая организация: **ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»**

Защита состоится «05» апреля 2013 года в 13³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.220.062.02 при ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

Автореферат разослан «___»_____ 2013 года и размещен на сайтах: ВАК Минобразования и науки РФ <http://vak.ed.gov.ru> «___» _____ 2013 г., ФГБОУ ВПО «Ставропольский ГАУ»: <http://www.stgau.ru> «___»_____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Дьяченко Юлия Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Современные данные по эпидемиологии дирофиляриоза позволяют говорить о широком распространении этого заболевания в различных странах мира, включая Россию. Ареал распространённости занимает по климатогеографической зоне широты от 41 до 58 град. северной широты (М.В. Сухова, 2002; В.Б. Ястреб, 2009). В России дирофиляриоз обнаружен в 39 субъектах (М.В. Сухова, 2002; А.Ю. Медведев, 2007; А.Ю. Аракельян, 2008; Ю.Г. Бескровная, 2009; А.С. Журавлев, 2009; В.Б. Ястреб, 2009; Т.Н. Сивкова, 2010; Н.В. Ярошенко, 2010). Распространению заболевания способствуют усиливающиеся миграционные процессы человека и животных, высокая приспособляемость зоонозов к новым условиям обитания, отсутствие должных санитарно-эпидемиологических мероприятий и др. По данным Суховой М.В. (2002), в Волгоградской области ежегодный прирост заболеваемости дирофиляриозом среди животных составляет 16%. Эта ситуация создает риск распространения заболевания как среди животных, так и среди людей. Так, в период с 1999 по 2003 год дирофиляриоз у человека выявлен в 150 случаях (Е.В. Михайлова, 2008; Ю.Г. Бескровная, 2009). Случаи дирофиляриоза зафиксированы у жителей в Московской, Тульской областях, Алтайского края, Тюмени, Нижнего Поволжья, Краснодарского края и других регионов (Т.И. Авдюхина, В.Г. Супряга, В.Ф. Постнова, 1997; Н.А. Азарова, В.П. Прейдер, 1999; Л.И. Карпук и др., 2000; В.В. Гуськов и др., 2001; А.В. Ушаков, Т.Ф. Степанова, А.С. Стругова, 2002; А.М. Бронштейн, В.Г. Супряга и др., 2003; М.В. Григорьев, Е.В. Дворовенко, 2003). К 2004 году в России отмечено уже 300 случаев дирофиляриозной инвазии у человека (В.Г. Супряга и др., 2004; С.А. Нагорный, В.В. Карташов, А.А. Артамонова, Ю.Г. Бескровная, 2005).

Авторы указанных исследований утверждают, что эти данные не отражают настоящей ситуации, так как много случаев остается неучтенными. Вполне очевидно, что при сохранившихся тенденциях заболеваемость дирофиляриозом будет увеличиваться. В научной литературе продолжают появляться сообщения об обнаружении дирофиляриоза у человека (Р.С. Аракельян с соавт., 2011; Н.Е. Белова, 2012; М.Г. Тухбатуллин, Р.Ф. Гайнутдинова, 2012).

Экономическая сторона данной проблемы заключается в том, что заболевание имеет выраженную тенденцию к распространению среди специальных групп собак (питомники силовых структур), на подготовку которых затрачиваются значительные средства (Н.В. Серебрякова, А.М. Ермаков, И.В. Колодий, 2008).

Локализация паразита *Dirofilaria immitis* в малом круге может проявляться в виде пневмонии либо сопровождаться клиникой тромбоэмболии малого круга кровообращения (П.В. Колесников, 2009; И.В. Колодий, 2009). Проявления могут быть выраженными, а могут протекать

бессимптомно. Так, по данным Ястреба В.Б. (2009), тяжелое течение отмечено в 37,7 % случаев, средней степени тяжести – в 29,8%, а бессимптомное – в 32,5 % случаев.

Изучение малого круга кровообращения и легких ранее проводилось отдельными отечественными учеными (П.В. Колесников, 2009). Была описана клиническая картина острой эозинофильной пневмонии, тромбоэмболии легких при дирофиляриозе. Однако, при всей очевидности патогенеза этих поражений, остается много нерешенных вопросов. В частности, не изучены более глубокие механизмы поражения легочной ткани, эндотелия и сурфактантной системы. Интерес к этим проблемам обусловлен несколькими причинами. В последнее время стало известно, что один из компонентов сурфактантной системы, в частности, белок-D (SP-D) играет существенную роль в местной иммунной защите легких от различного рода инфекций (А.Е. Абатуров, 2011; 2012; Clark, Reid, 2002; 2003; Whitsett, 2002; Wu, Kuzmenko, Wanetal., 2003). Была выявлена способность данного белка определять выраженности иммунного ответа и степень активации воспалительного процесса легочной ткани (Crouch, Wright, 2001; Kishoreetal., 2005; Hartl, Griese, 2005). Изучение данного компонента сурфактантной системы легких в условиях заражения дирофиляриозом представляет научный и практический интерес.

В последние годы в генезе многих заболеваний, включая и неинфекционные, большое значение придается поражению или дисфункции эндотелия (О.А. Гомазков, 2001; Т.Ю. Калюта, О.Е. Царева, А.Д. Трубецков и др. 2005; А.И. Ковалев, Г.И. Марцинкевич, Т.Е. Сулова, А.А. Соколов, 2004; Р.Г. Оганов, Г.В. Погосова, 2007; О.В. Костенко, 2008; Coats, 2004). С учетом того, что эндотелий представляет собой важнейший компонент аэрогематического барьера легких является актуальной задачей исследование его функций при дирофиляриозе у собак.

Современное состояние данного вопроса и вышеназванные предпосылки определили выбор темы нашего исследования.

Объект исследования: породные и беспородные собаки обоих полов в возрасте от 1 до 12 лет, инвазированные *D.immitis* собаки, кровь, легкие павших животных.

Предмет исследования – механизмы и маркеры повреждения гистогематического барьера легких собак с дирофиляриозом.

Научная гипотеза. Размножение и развитие дирофилярий в сосудах малого круга кровообращения сопровождается продукцией ими биологически активных соединений, запускающих каскад реакций, характеризующихся повреждением структуры и функции гистогематического барьера легких. Используя современные маркеры, можно показать и предположить роль отдельных факторов в механизме повреждения легких при дирофиляриозе у собак.

Цель исследования: изучить функциональное и морфологическое состояние гистогематического барьера легких и его отдельных компонентов у собак при дирофиляриозе.

Задачи исследования:

1. Изучить функциональное состояние гистогематического барьера легких у здоровых и больных дирофиляриозом собак по отношению к белку-D сурфактанта легких (SP-D) в зависимости от возраста, пола и породы собак.

2. Оценить функциональное состояние эндотелия у здоровых и больных дирофиляриозом собак в зависимости от возраста, пола и породы собак.

3. Сопоставить особенности морфологических изменений с функциональным состоянием гистогематического барьера легких у собак с дирофиляриозом.

4. Дать комплексную функционально-морфологическую оценку аэрогематического барьера легких у больных дирофиляриозом собак.

Научная новизна. Впервые получена функциональная и морфологическая характеристика аэрогематического барьера легких у здоровых и инвазированных дирофиляриозом собак. Получены данные о дисфункции эндотелия, характеризующиеся в уменьшении синтезирующей функции по отношению к фактору Виллебранда при хроническом течении заболевания. Впервые получены данные о резистентности аэрогематического барьера по отношению к белку-D (SP-D) сурфактанта легких. Выявлены возрастные и половые особенности резистентности аэрогематического барьера легких по отношению к белку-D сурфактанта легких у здоровых и больных дирофиляриозом собак. Установлено, что при остром и хроническом течении воспаления в легких резистентность барьера по отношению к белку-D закономерно изменяется. В патоморфозе определены фазы течения воспалительного процесса в легких при дирофиляриозе. Впервые проведены сопоставления морфологической картины легких и их метаболических функций по отношению к белку-D сурфактанта легких.

Теоретическая значимость. Заключается в обосновании использования маркера белка-D сурфактанта для оценки состояния гистогематического барьера легких и степени его повреждения. Полученные данные о динамике изменений концентрации белка-D и фактора Виллебранда являются новыми элементами патогенеза органических повреждений, в частности, легких при дирофиляриозе.

Практическая значимость. Полученные данные по концентрации белка-D и фактора Виллебранда у здоровых и больных собак разного пола и возраста могут служить в качестве нормативных и критерияльных показателей в лабораторной диагностике поражения легких. Имеющиеся доказательства наличия дисфункции эндотелия и ослабле-

ния местной иммунной защиты легких диктуют необходимость разработки и применения коррекции указанных нарушений. Дополнительные сведения о патогенезе поражения легких и развитии гипоксии при дирофиляриозе у собак могут быть использованы в научно-педагогической практике ветеринарных и биологических факультетов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Течение дирофиляриоза у собак сопровождается изменениями функциональных и морфологических характеристик гистогематического барьера легких, нарушением обмена белка-D в легких, эндотелиальной дисфункцией, уменьшением дыхательной поверхности легких и последующим развитием гипоксии.

2. Резистентность гистогематического барьера легких по отношению к белку-D сурфактанта легких с возрастом, как у здоровых, так и больных дирофиляриозом собак, независимо от их породы, изменяется фазно и зависит от пола животного.

3. Проницаемость гистогематического барьера легких по отношению к белку-D и активность фактора Виллебранда зависят от характера и выраженности воспалительной реакции в легких и половой принадлежности животного.

Материалы исследования были обсуждены: на Международной конференции «Актуальные вопросы науки и образования» (Москва, 2012 г.); Международной конференции «Фундаментальные исследования» (Израиль, 2012 г.); Всероссийской конференции «Инновационные пути развития агропромышленного комплекса: задачи и перспективы» (Зерноград, 2012 г.); XX Всероссийской научно-практической конференции «Образование-наука-технологии» (Майкоп, 2012 г.); на межлабораторном совещании в Государственном научном учреждении «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук» (Новочеркасск, 2012); на Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение устойчивого развития отрасли животноводства Российской Федерации» (Новочеркасск, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных статей, из них 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад. Представленные в диссертационной работе экспериментальные исследования, теоретический и практический анализ полученных результатов проведены автором самостоятельно. В выполнении морфологической части работы консультативную помощь оказывал кандидат медицинских наук, доцент Г.В. Левин.

Реализация результатов исследований. Полученные показатели концентрации белка-D и фактора Виллебранда у собак внедрены в диагностических лабораториях Научно-исследовательского института Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону), ГБУ «Бузулукское районное управление ветеринарии», «Медицинский центр профилактиче-

ской медицины» (г. Астана, Казахстан); в учебный процесс и иммуногенетическую лабораторию ГБОУ ВПО Адыгейского государственного университета, в преподавание дисциплины «Паразитология и инвазивные болезни животных» аграрного факультета Российского университета дружбы народов. Полученные данные по механизмам повреждения легких при диروفилариозе у собак могут использоваться в учебном процессе по специальностям «Биология», «Ветеринария» и «Зоотехния».

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов и заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка. Материал изложен на 120 страницах, иллюстрирован 25 рисунками и микрофотографиями, 24 таблицами. Библиографический список включает в себя 228 наименований, из них 75 отечественных и 153 зарубежных автора.

Материал и методы исследования.

Всего обследовано 113 собак из специализированных питомников силовых структур г. Ростова-на-Дону, Краснодара и службы по отлову животных г. Бузулука (табл. 1). Из указанного количества прижизненно у 101 собаки (37 здоровых и 64 больных собак) исследовали концентрацию в крови белка-D сурфактанта легких и фактора Виллебранда. Возраст собак составил от 1 до 12 лет. Из этой группы 19 собак с диروفилариозом были эвтаназированы по показаниям и на вскрытии у них обнаружены зрелые диروفиларии в сердце и легочных артериях; 12 здоровых собак, погибших от автотравмы, служили контролем при исследовании гистологической картины легких.

Для функциональной характеристики аэрогематического барьера был выбран белок-D (SP-D) сурфактанта легких. Выбор обусловлен тем, что этот белок обладает двойственными характеристиками. С одной стороны, обладая гидрофильностью, белок обеспечивает адекватную степень увлажнения сурфактанта и ряд других его физических характеристик. С другой стороны, белок-D обеспечивает защиту респираторного тракта от инфекционных агентов (А.Е. Абатуров, 2011; Jounblat et al., 2004; Hartl, Griese, 2006; Kishore et al., 2006).

Учитывая, что метаболизм сурфактанта происходит на уровне альвеолярного пространства (Clark, Reid, 2003), появление компонентов сурфактанта в крови может свидетельствовать о снижении резистентности аэрогематического барьера легких.

Определение концентрации SP-D осуществляли иммуноферментным методом (автоматический иммуноферментный анализатор "Alisei", Италия) с использованием тест-наборов для собак фирмы «Cusabio» (КНР). Концентрация белка выражалась в нг/мл.

Другой маркер – фактор Виллебранда (WF) был выбран по следующим причинам. Данный фактор синтезируется мегакариоцитами и преиму-

шественно эндотелием (А.И. Грицюк, Е.Н. Амосова, И.А. Грицюк, 1995; В.В. Долгов, П.В. Свирин, 2005). С учетом этого интенсивность синтеза данного фактора в основном определяется функциональным состоянием мегакариоцитов и эндотелия (З.С. Баркаган, 2000; Ф.Дж. Шиффман, 2000).

Для определения фактора Виллебранда использовался иммуноферментный метод и тест-наборы для собак фирмы «Cusabio» (КНР). Анализы выполнены в аккредитованной лаборатории НИИ биологии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).

Клиническое обследование здоровых и больных животных проводили по общепринятой методике с последующим занесением результатов в соответствующие протоколы и истории болезни. У животных из подкожной вены предплечья, латеральной вены сафены утром натощак брали кровь, которую затем исследовали на наличие микрофилярий методом насыщенного (обогащенного) мазка по Knott и иммунохроматографическим методом (Canine SNAP 4Dx, IDEXX) для качественного выявления специфических антигенов *Dirofilaria immitis*.

Для гистоморфологического исследования кусочки легких фиксировали в нейтральном формалине и заливали в парафин (Б. Рамейс, 1954), после чего изготавливались микросрезы толщиной 5-6 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин и эозином (М.С. Роскин, 1955).

Для количественной оценки выраженности патологического процесса использовалась морфометрическая методика Г.Г. Автандилова (1990). Для оценки дыхательной поверхности легких был введен индекс А/МА-соотношение площадей альвеол к площади альвеолярного пространства.

Таблица 1 - Экспериментально-клинический материал и методы исследования

№ п/п	Характер исследования	Количество животных
1.	Изучение морфологической картины легких у здоровых собак, погибших от автотравмы	12
2.	Изучение морфологической картины легких у больных дирофиляриозом собак	19
3.	Исследование концентрации белка-D сурфактанта легких у здоровых собак разных пород	37
4.	Исследование фактора Виллебранда у здоровых собак разных пород	37
5.	Исследование концентрации белка-D сурфактанта легких у больных дирофиляриозом собак разных пород	64
6.	Исследование концентрации фактора Виллебранда у больных дирофиляриозом собак разных пород	64
7.	Клиническая оценка течения дирофиляриоза	101
8.	Идентификация дирофиляриоза методом обогащенной капли по Knott	82
9.	Идентификация дирофилярий иммунохроматографическим методом	82

Статистическую обработку проводили с помощью методов вариационной статистики, корреляционного анализа по Спирмену, точного критерия Фишера и Хи-квадрат с использованием стандартной компьютерной программы «Biostat». Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение.

Как показали исследования, определение SP-D в плазме крови здоровых собак выявили значительные колебания данного маркера в крови в основном в диапазоне от 0,20 нг/мл до 51,05 нг/мл. Однако в 13,5% эти показатели оказались более 100 нг/мл (101,08 нг/мл-200,0 нг/мл). Средняя концентрация в исследуемой группе составила $6,36 \pm 3,28$ нг/мл (табл. 2). Сравнение показателей концентрации по половому признаку не выявило достоверных различий ($P > 0,5$).

Таблица 2 - Сравнительный анализ содержания белка-D (SP-D) сурфактанта в плазме крови (нг/мл) здоровых и больных диروفилляриозом собак разных возрастов

Возрастные группы	Контингент животных	
	здоровые	больные
	концентрация, нг/мл	концентрация, нг/мл
1. Вся группа	$6,36 \pm 3,28$ (n=32)	$15,87 \pm 3,00$ (n=47) $p < 0,039$
2. До 2-х лет	$0,53 \pm 0,13$ (n=11) $p_{2-4} < 0,02$	$18,64 \pm 11,63$ (n=7) $p < 0,05$ $p_{2-3} < 0,002$
3. От 2-х лет до 8 лет	$6,88 \pm 3,53$ (n=16) $p_{2-3} < 0,1$ $p_{2-4} < 0,02$	$1,71 \pm 0,74$ (n=35) $p < 0,05$ $p_{3-2} < 0,002$
4. Более 8 лет	$56,83 \pm 14,2$ (n=5) $p_{4-2} < 0,02$ $p_{4-3} < 0,01$	$36,75 \pm 6,52$ (n=5) $p_{4-3} < 0,01$

*Примечание: p - достоверность рассчитана между показателями здоровых и больных собак.

Сравнение концентрации маркера SP-D в зависимости от породы, среди которых были представители пород немецкой овчарки, лабрадора, цвергшнауцера, ротвейлера, русского черного терьера, также не выявило достоверных различий. Однако интересные закономерности были выявлены при анализе показателей в зависимости от возраста. Так, наименьшая концентрация определялась у собак в возрасте от 1 до 2-х лет.

В возрастной группе от 2-х до 8 лет средняя концентрация по сравнению с группой 1-2 года значительно возрастала ($6,88 \pm 3,53$ нг/мл),

однако статистически различие не выявилось из-за большого разброса показателей статистического ряда.

Сравнение показателей в возрастной группе более 8 лет выявило достоверные различия ($56,83 \pm 14,20$ нг/мл) по сравнению с возрастной группой 1-2 года ($0,53 \pm 0,13$ нг/мл; $p < 0,02$) и с группой 2-8 лет ($6,88 \pm 3,53$ нг/мл; $p < 0,01$). Эти закономерности подтверждались при проведении корреляционного анализа между показателями концентрации SP-D и возрастом как у здоровых ($r = 0,66$; $p < 0,01$), так и у больных ($r = 0,74$; $p < 0,008$) собак.

Можно предположить, что с возрастом резистентность альвеолярного барьера снижается, и белок-D появляется в плазме крови здоровых собак. Не исключено, что высокие показатели маркера SP-D у здоровых собак могли быть обусловлены перенесенной легочной патологией. Надо полагать, что выявленные 13,5% собак с высокими показателями концентрации белка D, возможно, относились к такой категории собак.

Анализ показателей концентрации маркера SP-D у больных диروفилляриозом собак во всей исследуемой совокупности показал достоверно более высокие показатели ($6,36 \pm 3,28$ нг/мл – у здоровых, $15,87 \pm 3,00$ нг/мл – у больных; $p < 0,039$) концентрации белка-D, но неравнозначные в различных возрастных группах.

В отличие от группы здоровых собак, в группе больных лишь у одной особи уровень белка определялся более 100 нг/мл. Эти же особенности наблюдались и в группе до 2-х лет, но разница уже оказалась значительной и достоверной ($0,53 \pm 0,13$ нг/мл – у здоровых; $18,64 \pm 11,63$ нг/мл – у больных; $p < 0,05$).

Интересные показатели были обнаружены в группе более 2-х и менее 8 лет. Концентрация SP-D значительно оказалась ниже, чем у здоровых собак аналогичного возраста. Кроме этого, концентрация маркера больных собак оказалась достоверно ниже, чем в группе больных собак до 2-х лет.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях заболевания и хронического течения диروفилляриоза резистентность альвеолокапиллярной мембраны на определенном этапе возрастает. Возможно, что уменьшение концентрации плазменного пула белка-D свидетельствует о снижении синтезирующей функции альвеоцитов и клеток Клара у больных собак в возрасте от 2 до 8 лет. Это подтверждается более низкими показателями концентрации маркера у больных собак, особенно сук, по сравнению с группой здоровых собак такого же возраста. Здесь уместно провести аналогию с исследованиями, проведенными на людях, в которых показано, что развитие такого опасного осложнения, как респираторный дистресс-синдром взрослых (РДСВ), при котором ведущим механизмом является нарушение синтеза сурфактанта, значительно тяжелее протекает у женщин (Gong et al., 2004).

Анализ показателей в зависимости от половой принадлежности показал, что концентрация белка-D у особей женского пола с диروفилля-

риозом достоверно не отличалась от показателей здоровых собак аналогичного пола. Такой зависимости не было выявлено у кобелей (рис. 1); у больных кобелей концентрация достоверно ($p < 0,01$) оказалась выше ($8,13 \pm 1,08$ нг/мл), чем у здоровых ($2,97 \pm 1,74$ нг/мл). Соответственно, у больных кобелей концентрация значительно превосходила аналогичные показатели у сук ($p < 0,01$).

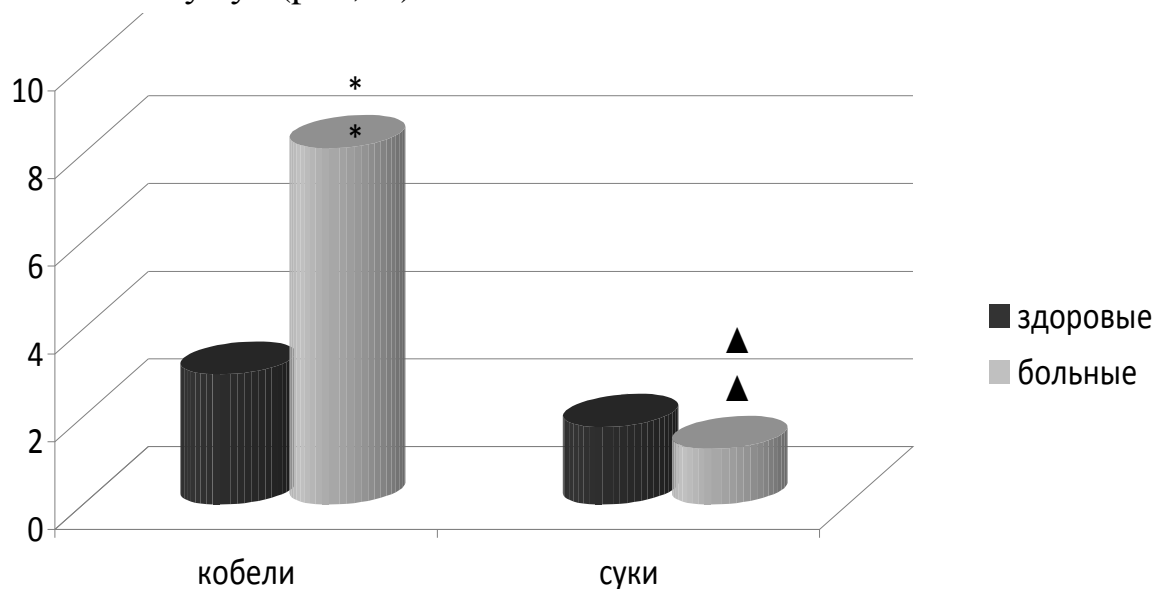


Рис. 1 - Концентрация белка-D у здоровых и больных собак разного пола

Примечание: ** - достоверность ($p < 0,01$) между показателями здоровых и больных собак; ▲▲ - достоверность ($p < 0,01$) между показателями собак разных полов.

Как оказалось, порода собак и степень проницаемости для SP-D не влияла на исследуемый показатель, однако у наиболее представительной группы больных – немецких овчарок, как и ожидалось, проницаемость оказалась выше, чем у здоровых ($2,34 \pm 1,27$ нг/мл – у здоровых; $8,41 \pm 3,74$ нг/мл – у больных).

Особый интерес представляли данные, полученные у собак с различной морфологической картиной заболевания. Были выделены 2 группы собак в зависимости от характера гистологической картины в легких: с признаками острого воспаления и с признаками хронизации процесса (рис. 2).

Оказалось, что острое течение пневмонии сопровождается значительным увеличением проницаемости аэрогематического барьера ($65,15 \pm 16,06$ нг/м), которая оказалась выше, чем у здоровых, и выше, чем у собак с хроническим характером течения воспалительного процесса в легких ($11,61 \pm 2,07$ нг/мл; $p < 0,006$).

Такое явление можно объяснить тем, что острое воспаление в легких сопровождается выбросом провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, FNO $_{\alpha}$ и др.), усилением оксидационных процессов, что сопровождается повышением проницаемости и выходом компонентов воспаления в про-

свет альвеол с повреждением системы сурфактанта (З.А. Лупинская, 2003; И.В. Зотова, Д.А. Затейщиков, Б.А. Сидоренко, 2005).

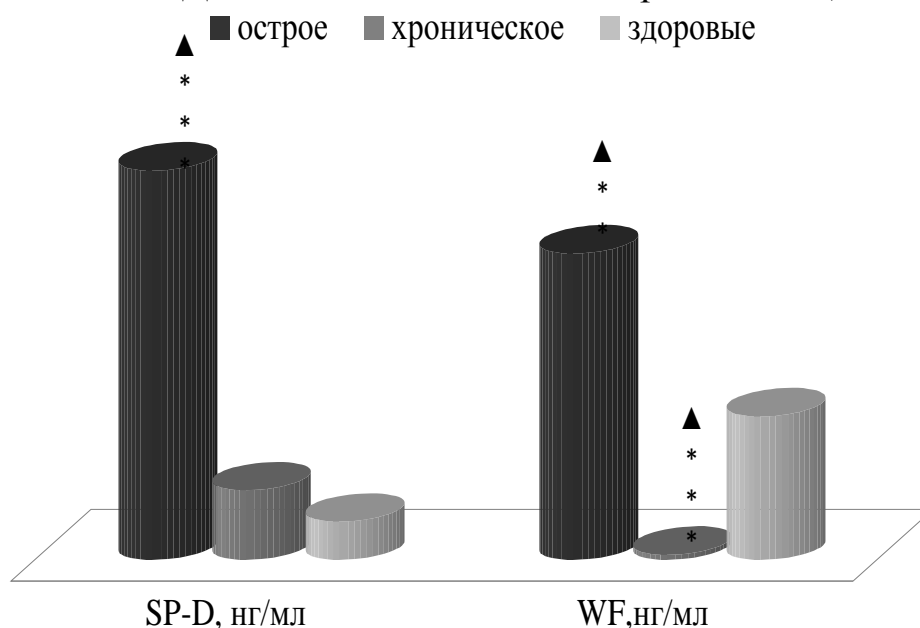


Рис. 2 - Концентрация белка-D сурфактанта и фактора Виллебранда в плазме крови собак в зависимости от характера течения воспалительного процесса в легких

Примечание: * - достоверность (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$) между показателями здоровых и больных собак; ▲ - достоверность ($p < 0,001$) между показателями собак с различных характером течения заболевания.

Известно, что в норме синтез и деградация сурфактанта происходят на уровне альвеоцитов и клеток Клара, при этом продукты синтеза или деградации в кровь либо не попадают, либо попадают в минимальном количестве (Haistma, U. Lachman, B. Lachman, 2004). В условиях повышенной проницаемости и увеличения отека интерстициальной ткани на первых этапах увеличивается образование лимфы в легких (Johnson et al., 1982). Так, в опытах отечественных авторов (С.А. Симбирцев, Н.А. Беяков, 1986), проведенных на модели микроэмболии легких у собак, отмечено увеличение лимфотока по грудному и правому лимфатическим протокам в течение 1,0-1,5 часов после эмболизации на 40%, а через 4 часа по правому лимфатическому протоку – в 7 раз. Это может быть механизмом проникновения компонентов сурфактанта, включая и белка-D, в сосудистое русло.

Выявленные изменения в системе сурфактанта, в частности, белка-D сурфактанта, у больных диروفилляриозом собак являются предпосылкой к снижению местной иммунной защиты легких с риском развития воспаления легких.

Следует обратить внимание на то, что, по современным данным, белок-D может определять и направление воспалительной реакции: либо по варианту острого воспаления, либо с переходом в хроническую форму. В этом случае SP-D может обеспечивать направленность иммун-

ных реакций либо за счет провоспалительных цитокинов: IL-1, TNF-2, IL-12, iFN γ , либо активацией макрофагов с выработкой противовоспалительных цитокинов: iL-10, iL-13 (Е.Н. Вассерман и соавт, 2010; Martinez, Sica, Mantovani, Locati, 2008).

Направленность этих реакций, как показано в наших исследованиях на примере острого и хронического воспаления легких, зависит от концентрации этого фактора в плазме крови. В этом отношении SP-D выступает как уникальный эндогенный фактор, действующий по принципу «два в одном» (С.В. Лямина с соавт, 2011).

Исходя из полученных данных, более активная деградация сурфактанта и белка-D, повышение плазменного пула SP-D сопровождаются острым течением, а умеренное повышение концентрации либо его отсутствие – переходом в хроническую форму воспаления в легких. Направленность этих реакций могла быть определена функциональным состоянием эндотелия, изменения которого мы обнаруживали при изучении его функциональных и морфологических характеристик.

Эндотелий является одной из важнейших составляющих гистогематического барьера легких и во многом определяет его характеристики, что особенно важно было рассмотреть в нашем исследовании.

Следует отметить, что у здоровых собак колебания концентрации фактора Виллебранда оказались весьма значительными и составили от 0,44 нг/мл до 120,50 нг/мл. Самое низкое значение определялось у цвергшнауцера, а самое высокое – у суки бельгийской овчарки. В то же время статистических различий концентрации фактора в зависимости от породы собак выявлено не было. Однако по половому признаку были обнаружены существенные отличия. Оказалось, что концентрация фактора Виллебранда у сук в значительной мере превышает таковую у кобелей ($31,62 \pm 6,03$ нг/мл и $6,20 \pm 1,65$ нг/мл – соответственно; $p < 0,002$). Корреляционной зависимости концентрации фактора Виллебранда от возраста животного ($r = -0,01$; $p < 0,5$) не выявлялось.

Таблица 3 - Сравнительный анализ содержания фактора Виллебранда в плазме крови (нг/мл) здоровых и больных диروفилариозом собак разных возрастов ($M_{cp} \pm m_0$)

Возрастные группы	Контингент животных	
	здоровые	больные
	концентрация, нг/мл	концентрация, нг/мл
Вся группа	$23,99 \pm 6,20$ (n=35)	$10,91 \pm 1,66$ (n=43) $p < 0,026$
До 2-х лет	$18,65 \pm 9,77$ (n=14)	$9,50 \pm 5,46$ (n=9)
От 2-х лет до 8 лет	$24,63 \pm 2,01$ (n=16)	$16,31 \pm 2,13$ (n=29) $p < 0,012$
Более 8 лет	$29,40 \pm 7,03$ (n=5)	$18,38 \pm 2,15$ (n=5)

*Примечание: достоверность рассчитана по отношению к показателям здоровых животных.

У больных собак синтезирующая функция эндотелия оказалась сниженной, что подтверждалось отсутствием особей с высокими показателями уровня фактора Виллебранда. Пределы колебаний показателя концентрации составили от 0,48 нг/мл до 36,59 нг/мл. В среднем во всей совокупности концентрация фактора составила $10,91 \pm 1,66$ нг/мл.

Снижение функциональной активности эндотелия у больных собак (табл. 3) доказывалось достоверным уменьшением концентрации фактора Виллебранда. Так, концентрация фактора Виллебранда у больных собак уменьшалась с $23,99 \pm 6,20$ нг/мл (у здоровых) до $10,91 \pm 1,66$ нг/мл (у больных), что подтверждалось высокой степенью достоверности различий ($p < 0,026$). Наиболее заметно эти изменения определялись в возрастной группе от 2 до 8 лет ($p < 0,012$).

Половые различия у больных собак оказались весьма существенными. Так, у сук концентрация фактора по сравнению с кобелями оказалась достоверно выше ($p < 0,03$), но по сравнению со здоровыми суками концентрация оказалась в 2 раза ниже ($31,62 \pm 6,03$ нг/мл – у здоровых сук; $16,32 \pm 2,84$ нг/мл – у больных; $p < 0,33$). В то же время у кобелей таких различий вообще не выявлялось ($p < 0,5$). Надо полагать, что глистная инвазия у особей мужского пола в меньшей степени нарушает синтезирующую функцию эндотелия, вероятно, из-за генетических особенностей, связанных с полом. Как и в случае с определением маркера SP-D, так и в случае определения фактора Виллебранда, различий по породам собак выявлено не было.

У животных с острым течением пневмонии отмечалась значительная активация синтеза фактора Виллебранда, концентрацию которого более чем в два раза ($23,99 \pm 6,20$ нг/мл – у здоровых; $51,29 \pm 6,93$ нг/мл – у больных собак) превосходила концентрацию, определяемую у здоровых собак ($p < 0,03$). В случае хронического течения процесса в легких имело место подавление синтезирующей функции эндотелия. Это подтверждалось значительным снижением уровня фактора Виллебранда у больных собак с хроническим течением воспаления в легких ($0,81 \pm 0,24$ нг/мл) как по сравнению с группой с острым течением ($p < 0,001$), так и по сравнению с группой здоровых собак (рис. 3).

Следовательно, при остром течении пневмонии обнаруживаются доказательства активации эндотелиальной функции с повышением синтеза фактора Виллебранда. При хроническом течении воспалительного процесса в легких обнаруживаются признаки эндотелиальной дисфункции, проявляющиеся в снижении синтеза эндотелием фактора Виллебранда. В современной физиологии эндотелий по гормональной активности рассматривается как одна из мощных эндокринных желез, вырабатывающая более 20 биологически активных субстанций (О.А. Гомазков, 2001; З.А. Лупинская, 2003). В первую очередь они обеспечивают местную регуляцию соответствия тонуса сосудов и реологических свойств крови. Наиболее активными в этом отношении являются эндотелин, ан-

гиотензин-II, брадикинин и оксид азота (О.А. Гомазков, 1995). При действии токсичных агентов, какими представляются продукты жизнедеятельности дирофилярий и сами дирофилярии, может активироваться образование продуктов перекисного окисления оксида азота-пероксинитрата, который сам по себе является мощным повреждающим агентом, повышающим проницаемость сосудов (П.П. Голиков, В.И. Картавенко, Н.Ю. Николаева и др., 2000). Кроме того, продукты жизнедеятельности паразита являются антигенами, которые вызывают иммунологическую реакцию на поверхности эндотелия и провоцируют каскад воспалительной реакции (К.А. Хайдаров, 2011). Отек интерстиция легких, который мы обнаруживали морфологически, может приводить к нарушению метаболической функции легочной ткани, что сопровождается снижением интенсивности инактивации ангиотензина-II и накоплением его в легких (Tel et al., 2005). Увеличение уровня ангиотензина-II приводит к пролиферации мышечного слоя сосудов, угнетению синтеза NO, усилению синтеза мощного вазоконстриктора-эндотелина (О.А. Гомазков, 1995; 2001; З.А. Лупинская, 2003), который увеличивает агрегацию тромбоцитов и эритроцитов в системе микроциркуляции и повышает артериальное давление в малом и большом круге кровообращения (Killy, Vaffigand, Smith, 1996). Важно отметить, что ангиотензин-II способствует образованию пероксинитрата (З.А. Лупинская, 2003). Такой комплекс является мощным цитотоксическим агентом, который способен повреждать эндотелий, интерстициальную ткань и сурфактант легких. При повреждении эндотелия начинают активно вырабатываться эндотелины, повышающие артериальное давление в большом и малом круге кровообращения (Killy, Vaffigand, Smith, 1996).

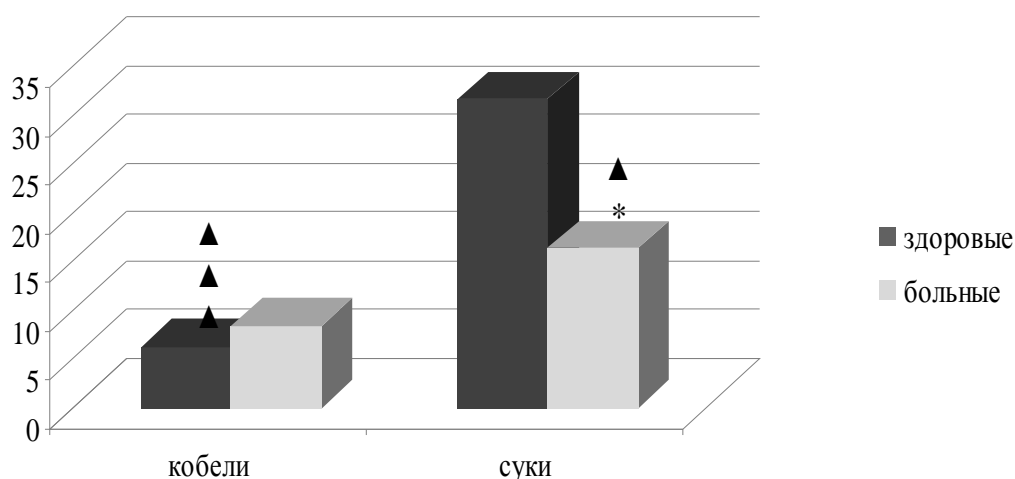


Рис. 3 - Содержание фактора Виллебранда у здоровых и больных сук и кобелей

Примечание: * - достоверность ($p < 0,05$) между показателями здоровых и больных собак одноименных полов; ▲▲▲ - достоверность ($p < 0,001$) между показателями собак разных полов.

Совокупность указанных факторов способствует формированию легочной гипертензии. При исследовании морфологической картины определялись признаки прекапиллярной гипертензии, наряду с ростом мышечного слоя сосудов и переходом их у части животных в склероз.

Следовательно, в генезе легочной гипертензии лежат не только механические факторы, обусловленные тромбозом сосудов малого круга дирофиляриями, но и совокупность метаболических факторов. С учетом этого целесообразно в комплексном лечении дирофиляриоза, вызванного *D. immitis*, применять блокаторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) либо блокаторы АТ-1 рецепторов ангиотензина-II.

Описанные закономерности в значительной степени соответствовали морфологической картине легких. Наши исследования гистологической картины легких при дирофиляриозе показали, что в начальной стадии (фазе) болезни в патоморфозе легких преобладают изменения, сходные с аллергической реакцией хозяина на внедрение микро- и дирофилярий, что проявляется в выраженной сосудистой реакции – гиперемии, стаза, микротромбоза. Характерным в эту фазу заболевания является нарушение кровообращения в микроциркуляторном русле, эксудативная воспалительная реакция со стороны сосудистой стенки, интерстиция и терминальных бронхов.

Во второй фазе заболевания поражение легких можно связать с механическим воздействием дирофилярий – тромбозами, тромбэмболиями, вторичной (прекапиллярная) гипертензией в малом круге кровообращения.

В третьей фазе заболевания преобладает токсическое и гипертоксическое воздействие, связанное с гибелью и лизисом дирофилярий. Обнаруживаются признаки интерстициальной, а в тяжелых случаях и очаговой геморрагической пневмонии.

Четвертая фаза характеризуется хронизацией воспалительного процесса с развитием пневмосклероза, фиброза, выраженной пролиферации и склероза мышечных слоев артериол.

Морфометрический анализ позволил выявить уменьшение площади просвета и площади альвеол на фоне увеличения площади межальвеолярной ткани (рис. 4).

Это подтверждалось достоверным снижением индекса А/МА ($p < 0,001$). Увеличение межальвеолярной ткани было обусловлено высокой степенью проницаемости для плазмы и форменных элементов крови. Результатом повышенной проницаемости аэрогематического барьера явилось появление значительных количеств SP-D в крови, особенно при остром воспалительном процессе в легких. При умеренной концентрации SP-D в крови реакция в легких протекает бессимптомно, а при значительных уровнях белка – с выраженной воспалительной реакцией. Такая картина вполне согласуется с имеющимися в литературе данными о

способности белка-D определять интенсивность воспалительной реакции (С.В. Лямина и соавт., 2011).

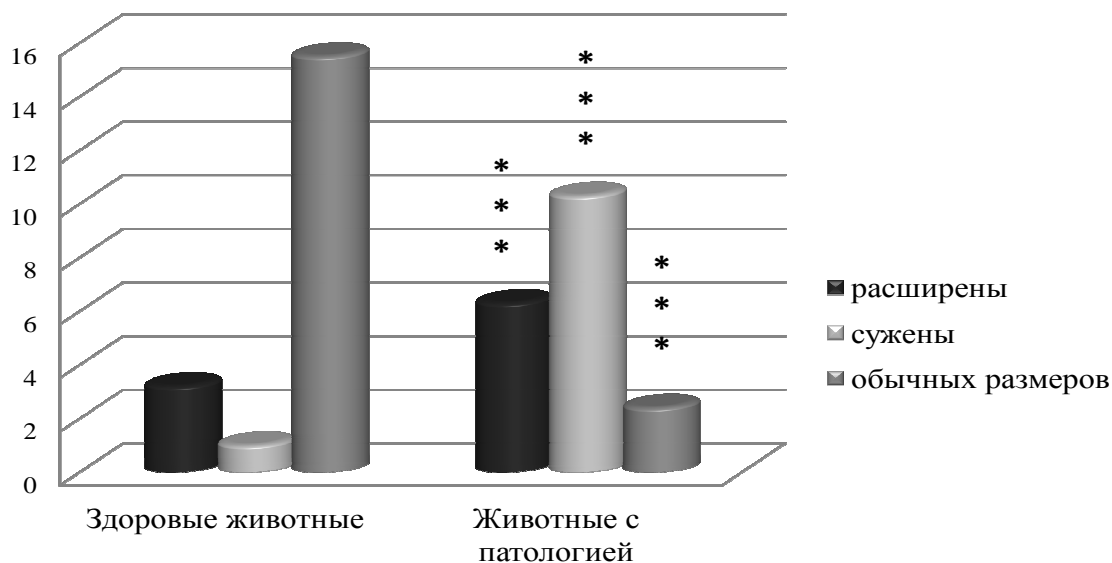


Рис. 4 - Морфометрические показатели альвеол легких здоровых и больных дирофиляриозом собак

Примечание: *** - достоверность ($p < 0,001$) рассчитана между показателями здоровых и больных собак.

На основании проведенных исследований и литературных данных нами представлена схема основных патофизиологических звеньев, лежащих в основе повреждения гистогематического барьера легочной ткани при дирофиляриозе (рис. 5).

Инвазия микрофиляриями приводит к их размножению в подкожной клетчатке, а затем – в сосудистом русле собаки, и особенно в таких местах, как легочные артерии и артериолы. По мере увеличения количества микрофилярий в кровь попадают продукты их жизнедеятельности, которые обладают общетоксическим, а также иммунным эффектом. На этом этапе в месте локализации микрофилярий и дирофилярий, в результате воздействия повреждающих факторов, возникает воспаление с выделением провоспалительных интерлейкинов, активных форм оксида азота, которые вызывают повреждение эндотелия.

Нарушения функции эндотелия (эндотелиальная дисфункция) приводят к повышенной проницаемости гемато-альвеолярного барьера для плазмы крови и форменных элементов с последующей активацией макрофагов. В результате нарушения трофической функции эндотелия, а также за счет появления плазмы в просвете альвеол нарушается структура и синтез сурфактанта. Это приводит к нарушению метаболизма основных компонентов сурфактанта, в том числе и исследуемого нами белка-D (SP-D). В результате повышенной проницаемости гистогематического барьера часть белка-D появляется в общем кровотоке.



Рис. 5 - Схема патогенеза поражения легких в условиях инвазии диروفилариями(d.immitis)

В зависимости от концентрации белка в плазме крови воспалительная реакция в легких может протекать по типу острого воспаления, а в случае незначительного количества белка воспаление в легких приобретает хроническое течение.

В этих условиях нарушаются синтез и инактивация биологически активных веществ (в частности, ангиотензина-II), способствующих пролиферации мышечного слоя сосудов, развитию склеротических изменений, формированию артериальной легочной гипертензии. Совокупность указанных факторов приводит к формированию острой либо хронической дыхательной недостаточности, которая в свою очередь приводит, по принципу обратной связи, к активации патогенетических факторов (легочная гипертензия, нарушения реологии крови, повышение проницаемости, изменение метаболической функции легких и др.), нарушающих дыхательную и мета-

болическую функцию легких. Гипоксия и снижение местной иммунной защиты легких, обусловленные нарушением метаболизма белка-D и эндотелиальной дисфункцией, являются факторами риска по развитию вторичных легочных осложнений и дыхательной недостаточности.

Проведенное нами исследование позволило сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ:

1. Дирофиляриоз сопровождается нарушением морфофункциональных характеристик гистогематического барьера легких, нарушением синтеза компонентов сурфактанта и его утилизации, развитием эндотелиальной дисфункции, уменьшением дыхательной поверхности легких с последующим развитием дыхательной недостаточности и гипоксии.

2. Резистентность аэрогематического барьера для белка-D с возрастом снижается, что подтверждается наличием достоверной прямой корреляционной связи между концентрацией маркера в плазме крови и возрастом как у здоровых особей ($r=0,66$; $p<0,01$), так и у больных собак ($r=0,74$; $p<0,008$), при этом наиболее выраженное снижение резистентности отмечено у больных собак в возрасте до 2-х лет, а белоксинтезирующей функции легких по отношению к белку-D в возрасте от 2-х до 8 лет.

3. Половые различия функционального состояния гистогематического барьера легких для белка-D в условиях инвазирования дирофиляриями характеризуются более высокой проницаемостью аэрогематического барьера независимо от породы собак у особей мужского пола и умеренной у особей женского пола.

4. В острой стадии воспаления в легких у больных дирофиляриозом собак резистентность аэрогематического барьера снижена, что характеризуется повышением концентрации белка-D в плазме крови, при этом уровень белка-D в значительной степени превосходит уровень белка-D у собак с хроническим процессом в легких.

5. Острое течение воспалительного процесса в легких характеризуется значительным увеличением концентрации фактора Виллебранда, а при хроническом – снижением, при этом как в условиях нормы, так и в условиях патологии концентрация фактора Виллебранда у особей женского пола превосходит аналогичные показатели особей мужского пола, особенно в возрастной группе от 2-х до 8 лет независимо от породы собак.

6. Морфологическая картина легких у собак, больных дирофиляриозом, свидетельствует о наличии неспецифического воспаления с фазным течением, характеризующимся в острой фазе нарушением проницаемости аэрогематического барьера, развитием отека интерстиция, кровоизлияниями в интерстиций и альвеолы, а в хронической фазе – склеротическими изменениями в сосудах и интерстиции с последующим развитием эмфиземы и ателектазов.

Практические рекомендации:

1. В научно-педагогической практике преподавания курса патологической физиологии при изложении патогенеза поражения малого круга кровообращения при дирофиляриозе целесообразно внести полученные автором сведения и схему поражения аэрогематического барьера легких.

2. С целью оптимизации лечения и профилактики поражений малого круга кровообращения целесообразно провести клиническое исследование и изучить влияние ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) либо блокаторов рецепторов-1 (АТ-1 рецепторов) ангиотензина-II.

3. Данные по содержанию фактора Виллебранда и белка-D сурфактанта легких у здоровых собак разных пород рекомендуется использовать в качестве нормативных показателей.

Публикации по теме диссертации:

1. **Ермаков А.М. Особенности патогенеза поражения легких в условиях инвазии дирофиляриями (*D.immitis*) / Ермаков А.М., Лысенкова А.С., Колодий И.В. // Ветеринарная патология.- 2012.- №4. - С. 71-73.**

2. **Ермаков А.М. Проницаемость аэрогематического барьера легких для белка-D сурфактанта (SP-D) у здоровых и пораженных дирофиляриозом собак / А.М. Ермаков, А.С. Лысенкова, И.В. Колодий // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.– 2013. - №1. - С. 16-18.**

3. Лысенкова А.С. Диагностическая ценность определения белка-D (SP-D) сурфактанта легких у здоровых и больных дирофиляриозом собак / А.С. Лысенкова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции аспирантов, докторантов и молодых ученых. - Майкоп: Изд-во Солодовникова А.Н., 2012.- С. 52-57.

4. Лысенкова А.С. Морфологическая картина легких собак с дирофиляриозом / А.С. Лысенкова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции (14-15 июня 2012 г.) «Научное обеспечение устойчивого развития отрасли животноводства Российской Федерации». - Новочеркасск, 2012. - С. 93-97.

5. Лысенкова А.С. Морфометрическая характеристика легких собак при поражении их дирофиляриозом / А.С. Лысенкова // Международный журнал экспериментального образования.- 2012.- №6.- С. 15-16.

6. Лысенкова А.С. Морфологические основы формирования легочной гипертензии у собак с дирофиляриозом / А.С. Лысенкова, И.В. Колодий // Материалы XX Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы современности».- Майкоп: МГТУ, 2012.- С. 187-189.

7. Лысенкова А.С. Нарушения проницаемости гистогематического барьера легких для белка-D сурфактанта у собак с дирофиляриозом / А.С. Лысенкова // Успехи современного естествознания.- 2012. -№7.- С. 140-141.

8. Лысенкова А.С. Оценка функционального и морфологического статуса гистогематического барьера легких у собак с дирофиляриозом / А.С. Лысенкова // Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс]. - 2013. - №1. - Режим доступа: www.science-education.ru/107-8221 (дата обращения: 29.01.2013).

9. Лысенкова А.С. Роль эндотелия в генезе поражения легких у собак с дирофиляриозом / А.С. Лысенкова // Материалы XX Всероссийской научно-практической конференции «Образование-наука-технологии».- Майкоп: Изд-во МГТУ, 2012.- С. 49-51.

10. Лысенкова А.С. Фактор Виллебранда в генезе дисфункции легких собак с дирофиляриозом / А.С. Лысенкова // Современные наукоемкие технологии.- 2012.-№7.- С. 55-57.

11. Лысенкова А.С. Характер поражений легких собак с дирофиляриозом и их морфометрическая характеристика / А.С. Лысенкова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции аспирантов, докторантов и молодых ученых.- Майкоп: Изд-во Солодовникова А. Н., 2012.- С. 49-52.

Лысенкова Антонина Сергеевна (Россия)

ФУНКЦИОНАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ЛЕГКИХ У СОБАК ПРИ ДИРОФИЛЯРИОЗЕ

На больных дирофиляриозом и здоровых собаках (n=113) исследованы проницаемость гистогематического барьера (ГГБ) легких для белка-D (SP-D) сурфактанта, синтез фактора Виллебранда (WF) и морфологическая картина легких. Установлено, что резистентность ГГБ легких с возрастом снижается как у здоровых, так и у больных дирофиляриозом собак. Наиболее выраженные нарушения проницаемости отмечены у кобелей в возрастной группе до 2-х лет. Острое течение воспалительного процесса в легких сопровождается повышением проницаемости ГГБ для белка-D (особенно у кобелей) и повышенным синтезом фактора Виллебранда, особенно выраженным у сук. При хроническом течении воспаления в легких отмечается снижение синтеза WF на фоне повышенной проницаемости для белка-D. Характерных изменений, связанных с породой собак, выявлено не было. Гистологическая картина легких характеризуется фазными изменениями, отражая переход острого воспаления в хроническое. Описанные нарушения являются основой для формирования дыхательной недостаточности и гипоксии.

Lysenkova Antonina Sergeevna, Russia

**FUNCTIONAL-MORFOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF HISTO-HAEMATICAL BARRIER OF LUNGS IN DOGS
SUFFERING FROM DIROFILARIOSIS**

Our sample was made up of healthy and dirofilariosis infected dogs (n=113), the goal of research was to analyze the permeability of the HHB for the SP-D protein, production of von Willebrand factor and morphological view of lungs. An analysis of the results from testing canines demonstrated that resistance of HHB of lungs towards SP-D correlates with the age and goes down by the age of the entire pool of healthy and infected dogs. Most significant violations of permeability of HHB were observed among males in the age group under 2 years. Acute type of inflammation of lungs characterizes by increase of permeability of HHB for SP-D (especially, among males) and by high production of von Willebrand factor among female dogs. Chronic type of inflammation is characterized by increase of permeability of HHB for SP-D and, at the same time, reduction of production of von Willebrand factor. However, significant differences were not observed according to any particular breed. Histological view of lungs characterizes by phases, which illustrate transition from acute to chronic inflammation. Thus, described violations serve a base for respiratory insufficiency and hypoxia.

ЛЫСЕНКОВА Антонина Сергеевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ЛЕГКИХ
У СОБАК ПРИ ДИРОФИЛЯРИОЗЕ**

А в т о р е ф е р а т

Подписано в печать 27.02.2013 г.

Формат бумаги 60x84¹/₁₆. Бумага ксероксная. Гарнитура Таймс.

Усл. печ. л. 1,25. Заказ №012. Тираж 100 экз.

ИП Коблева М.Х.

385000, г. Майкоп, пер. Дачный, 22

