

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ЛЕГКИХ У СОБАК С ДИРОФИЛЯРИОЗОМ

Лысенкова А.С.

Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт ГНУ «СКЗНИВИ» Россельхозакадемии, Новочеркасск, Россия (346421, Ростовская область, г. Новочеркасск, Ростовское шоссе, 26), e-mail: lysenkova.antonina@yandex.ru

Проведено исследование состояния гистогематического барьера легких у здоровых и больных диروفилариозом собак. Установлены закономерности, характеризующиеся увеличением синтеза фактора Виллебранда и белка-D сурфактанта легких при остром течении воспалительного процесса в легких и снижением продукции указанных маркеров при хроническом течении заболевания. При хроническом течении заболевания наблюдалось уменьшение поверхности альвеол, их ателектазы и эмфизема, гипертрофия мышечного слоя сосудов. Острое течение характеризовалось признаками повышенной проницаемости с выходом форменных элементов в просвет альвеол, деформацией эндотелия. Указанные изменения расцениваются как дисфункция системы сурфактанта и эндотелия. Дыхательная поверхность уменьшалась за счет увеличения объема интерстиция и уменьшения количества альвеол с нормальными размерами. Как при остром, так и при хроническом течении выявленные изменения лежат в основе дыхательной недостаточности.

Ключевые слова: диروفилариоз, собаки, белок-D сурфактанта, легкие, фактор Виллебранда.

APPRAISAL OF FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL STATUS OF HISTOHAEMATICAL BARRIER OF LUNGS OF DOGS INFECTED BY DIROFILARIA IMMITIS

Lysenkova A. S.

North-Caucasus Zonal Scientific-Research Veterinarian Institute of Russian Academy of Agriculture; Novochoerkassk, Russia (346 421, Rostovskaya obl., Novochoerkassk, Rostovskoe shosse, 26), e-mail: lysenkova.antonina@yandex.ru

Was made investigation of histohaematical barrier of lungs of healthy dogs and dogs infected with dirofilariasis. Were identified regularities, which point on increase of production of von Willebrand factor and surfactant protein D according to acute process of disease and reduction of these markers in conditions of chronic process. In case of chronic process were noticed hypertrophy of muscular elements of blood-vessels of pulmonary circulation, reduction of alveolar area, signs of atelectasis and emphysema. In case of acute process microscopically were identified erythrocytes with sludge-effect, appearance of erythrocytes in alveols, deformation of endothelium. Mentioned signs are typical for disfunction of endothelium and surfactant system. Respiratory area of lungs decreased as a result of enlargement of interstition tissue and reduction of number of alveols with normal size. As in case of acute process, as well in conditions of chronic process, all these revealed changes serve as a base of respiratory insufficiency.

Key-words: dirofilariasis, dogs, surfactant protein D, lungs, von Willebrand factor.

Введение

Рост заболеваемости диروفилариозом домашних животных и человека [2; 4; 7] выдвигает перед биологической и медицинской наукой ряд проблем, способствующих сдерживанию этой тенденции. Наносится ощутимый вред обществу посредством снижения качества жизни общества, включая и неблагополучие здоровья домашних животных.

Несмотря на определенные успехи в изучении эпидемиологии диروفилариоза, его диагностики и лечения, проблема изучения механизмов поражения конкретных органов и систем остается открытой. В частности, с учетом излюбленной локализации *Dirofilaria immitis* в сосудах малого круга, легочном стволе и легочных артериях [5; 6],

представляет интерес изучить функциональные и морфологические характеристики гистогематического барьера легких. Его отдельные компоненты определяют местную иммунную защиту, проницаемость для газов, соотношение перфузии и газообмена в легких, регуляцию сосудистого тонуса, метаболическую активность легких и др. Среди указанных компонентов в поле зрения ученых в последние годы попали опсонизирующие белки сурфактанта и эндотелий. В семействе белков интенсивно изучается белок-D (SP-D) сурфактанта легких, который обладает рядом уникальных свойств, связанных с регуляцией иммунного ответа на внедрение в легкие инфекции [8; 9]. От его содержания во многом зависит интенсивность и направленность воспалительной реакции в легочной ткани [10]. Другой важный компонент гистогематического барьера легких – эндотелий обеспечивает барьерные функции со стороны сосудистого русла. С учетом многообразия метаболических и гормональных функций эндотелия [3] получение информации о данном отделе барьера легких чрезвычайно важно для понимания патогенеза поражения легких при дирофиляриозе.

Цель исследования – получить данные о состоянии гистогематического барьера легких при остром и хроническом их воспалении у собак с дирофиляриозом.

Материал и методы исследования. Для характеристики функционального состояния гистогематического барьера легких использовали 2 маркера: белок-D (SP-D) сурфактанта легких и фактор Виллебранда (WF). Исследование указанных факторов проведено на 33 здоровых и 19 больных дирофиляриозом собаках (питомник силовых структур г. Ростова-на-Дону и службы по отлову животных г. Бузулук). У всех 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*. Определение концентрации белка-D (SP-D) и фактора Виллебранда (WF) осуществляли иммуноферментным методом с использованием тест-наборов для собак фирмы Cusabio (КНР). Концентрация белка выражалась в нг/мл.

Морфологический материал получен от 19 собак, больных дирофиляриозом, на вскрытии у которых были обнаружены в полостях сердца и легочных артериях дирофилярии. Больные собаки по особенностям гистологической картины были разделены на 2 группы: с признаками острого воспаления в легких и признаками хронизации процесса. В качестве контроля служили легкие 12 здоровых собак, погибших от травмы. Гистологическую картину исследовали в окраске гематоксилин-эозином, морфометрическую оценку проводили по методике Г.Г. Автандилова [1].

Цифровой материал обработан с помощью вариационной статистики с использованием стандартных программ Biostat и критерия Стьюдента. Уровень достоверности принят $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. В первой группе ($n=10$; возраст от 1,5 до 7 лет) гистологическая картина легких характеризовалась спазмом гладкой мускулатуры бронхов, субэпителиальным отеком, макрофагальной инфильтрацией. В сосудистом русле легких наблюдалось полнокровие в капиллярах интерстиция, стазы, сладжи, тромбы. Макрофаги в виде гемосидерофагов обнаруживались почти постоянно в интерстиции и просвете альвеол. При интерстициальной пневмонии обнаруживалось полнокровие, стазы и лейкостазы в микроциркуляторном русле, отек межальвеолярных перегородок, круглоклеточная воспалительная инфильтрация. В отдельных случаях развивалась очаговая геморрагическая пневмония. Обнаруживались признаки повышенной проницаемости сосудистой стенки с выходом плазмы и клеточных элементов в интерстиций и просветы альвеол. Описанные разновидности ответа можно расценить как острую реакцию легочной ткани на возбудитель и продукты его жизнедеятельности.

Клинические проявления при остром течении легочного процесса были следующими: субфебрильная лихорадка, минимальные респираторные нарушения в виде умеренного сухого кашля, реже наблюдалось выделение вязкой и кровянистой мокроты. Аускультативно было выявлено: жесткое дыхание, реже бронхиальное, выдох удлинен, рассеянные сухие хрипы над обеими легочными полями, над зонами притупления (при перкуссии) звука – ослабленное дыхание, мелкопузырчатые хрипы. Пульс – умеренно учащен, ритмичный, среднего наполнения. При аускультации сердца на 1-й, 2-й, 4-й точках аускультации – 1-й тон ослаблен, акцент второго тона на легочном стволе. При перкуссии печень выступает на 2 см ниже реберной дуги, плотная, безболезненная, периферических отеки не определялись.

Хроническое течение (вторая группа) зафиксировано у 9 собак в возрасте от 3 до 11 лет. Гистологически определялись признаки хронизации процесса, что характеризовалось тромбозами и эмболией терминальных артериол и более крупных ветвей легочной артерии вместе с поражением микроциркуляторного русла, бронхоспазмом, уменьшением дыхательной поверхности. На гистопрепаратах определялась выраженная гранулематозная реакция с развитием множественных лимфоэпителиоидных гранулем на разных стадиях развития, что, по-видимому, является реакцией легочной ткани на микрофилярии. У отдельных собак выявлялись признаки прекапиллярной гипертензии в малом круге кровообращения: венозный застой, гипертрофия мышечных волокон, эластофиброз и склероз сосудистой стенки.

Клиническое течение не имело выраженной картины и проявлялось скудным кашлем, одышкой, прогрессирующей при выполнении физической нагрузки. Концентрация исследуемых маркеров представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Концентрация белка-D сурфактанта (SP-D) легких и фактора Виллебранда (WF) у погибших собак в зависимости от характера течения процесса в легких

№ п/п	Характер течения	Исследуемые маркеры	
		SP-D, нг/мл	WF, нг/мл
1.	Острое (n=10)	65,15±16,06 P ₁₋₃ < 0,001	51,29±6,93 P ₁₋₃ < 0,03
2.	Хроническое (n=9)	11,61±2,07 P ₁₋₂ < 0,006 P ₂₋₃ < 0,5	0,81±0,24 P ₁₋₂ < 0,001 P ₂₋₃ < 0,06
3.	Здоровые (n=33)	6,36±3,28	23,99±6,20

Как показал анализ (табл. 1), острое течение заболевания в легких, проявляющееся в форме интерстициальной, эозинофильной либо геморрагической пневмонии характеризуется значительным ростом концентрации белка-D в плазме крови. Эти концентрации в значительной мере оказались ниже, чем в группе с хроническим течением заболевания. Уровень фактора Виллебранда при остром течении в десятки раз превосходил аналогичный показатель при хроническом течении воспалительного процесса в легких.

Сравнение показателей болеющих животных со здоровыми показало, что концентрация белка у собак с острым течением пневмонии во много раз превосходила аналогичные показатели здоровых животных. Однако при хронизации процесса такие различия исчезали, и концентрация белка у больных животных мало отличалась от концентрации здоровых собак.

Аналогичное сравнение по фактору Виллебранда свидетельствует о значительном росте этого фактора при остром течении пневмонии. Однако при хроническом течении отмечена обратная реакция – значительный дефицит фактора по сравнению со здоровыми животными.

Морфометрический анализ во всей совокупности больных собак показал, что площадь дыхательной поверхности значительно сокращается за счет уменьшения количества нормальных альвеол и увеличения площади интерстиция (табл. 2).

Таблица 2 – Морфометрические показатели альвеол (усл. ед.) здоровых и больных диффузными заболеваниями собак

Морфологический признак	Здоровые животные (n=12)		Животные с патологией (n=19)	
	кратность изменений			
Расширены	3,2±0,1	1,9	6,3±0,2	p<0,0001
Сужены	1,0±0,09	10,3	10,3±0,1	p<0,0001
Обычных размеров	15,5±0,2	5,4	2,4±0,1	p<0,0001

В условиях патологии просвет альвеол уменьшился за счет появления в их просвете эритроцитов, при этом просвет альвеол во всех случаях также был уменьшен. Элементы сладжирования эритроцитов в просвете сосудов выявлялись во всех случаях (p<0,0001), практически во всех случаях (18 из 19) обнаруживались сидерофаги, макрофаги, дистрофические фибробласты с кариопикнозом и кариорексисом, эндотелиоциты (у 14 из 19).

Анализируя каждый из факторов, можно увидеть, что наиболее выраженным патологическим признаком оказалось появление эритроцитов (в 7,2 раза) в просвете альвеол и, соответственно, появление сидерофагов (в 25,7 раза). Далее по мере убывания морфологические признаки распределились в следующей последовательности: увеличение макрофагов и лимфоцитов (в 2 раза), фибробластов (в 1,4 раза). Соответственно, эти изменения приводили к уменьшению просвета альвеол (в 1,6 раза).

Выявленные изменения в легких создают предпосылки к формированию хронической дыхательной недостаточности с вытекающими последствиями. Следовательно, можно сделать заключение о том, что картина острого воспаления легких характеризуется повышенной проницаемостью для белка-D и значительной активацией фактора Виллебранда. Рост фактора Виллебранда, вероятно, является ответной реакцией на поражение эндотелия, обусловленное агрессивным воздействием токсических факторов жизнедеятельности микрофилярий. Поражение эндотелия, что подтверждается и морфологически, способствует увеличению проницаемости барьера кровь – ткань – воздух, выходу жидкой части и форменных элементов в интерстиций, а затем и в альвеолы с последующей деградацией системы сурфактанта, формированию легочной гипертензии. В условиях повышенной деградации сурфактанта альвеолярные макрофаги не справляются с повышенной нагрузкой, направленной на утилизацию сурфактанта. В результате часть сурфактанта и его составляющих реабсорбируется в лимфу и затем появляются в крови; другая часть непосредственно проникает в кровь через аэрогематический барьер вследствие повышенной его проницаемости. Логично допустить, что концентрация белка-D в плазме крови пропорциональна интенсивности его образования клетками Клара. По-видимому, при

хроническом течение процесса происходит относительная нормализация проницаемости гистогематического барьера для белка-D и значительный дефицит фактора Виллебранда, обусловленный снижением метаболической активности эндотелия. Эти изменения являются основой для формирования эндотелиальной дисфункции, нарушения системы сурфактанта, развития хронической дыхательной недостаточности.

Выводы

1. Дирофиляриоз вызывает поражение легких, характеризующееся нарушением структуры эндотелия, увеличением проницаемости для плазменных белков и форменных элементов, повышенной макрофагальной активностью, разрастанием мышечных элементов сосудов малого круга с признаками его гипертензии, повреждением функции сурфактанта и эндотелия, уменьшением дыхательной поверхности легких.
2. Острое течение воспаления в легких характеризуется повышенной проницаемостью аэрогематического барьера по отношению к белку-D сурфактанта легких и активацией синтеза фактора Виллебранда.
3. Хроническое течение воспаления в легких сопровождается снижением синтеза белка-D и фактора Виллебранда, повышением резистентности аэрогематического барьера по отношению к белку-D сурфактанта легких.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М. : Медицина, 1990. – С. 58-102.
2. Аракельян Р.С. [и др.] Применение препарата «Диронет» с профилактической целью в отношении служебных собак, инвазированных *Dirofilaria immitis*, на территории Астраханской области // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2011. – № 4. – С. 41-42.
3. Баркаган З.С. Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии. – М. : Ньюдиамед, 2000. – 142 с.
4. Белова Н.Е. Дирофиляриоз на территории нижегородской области // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2012. – № 2. – С. 18-20.
5. Колесников П.В. Диагностика и терапия кардиопульмональной недостаточности при дирофиляриозе у собак : дис. ... канд. вет. наук. – Волгоград, 2009. – 145 с.
6. Колодий И.В. Особенности ремоделирования правого желудочка собак при дирофиляриозе, вызванном *D. Immitis* : дис. ... канд. вет. наук. – Новочеркасск, 2009. – 106 с.
7. Ястреб В.Б. Рекомендации по диагностике, лечению и профилактике дирофиляриоза собак в московском регионе / В.Б. Ястреб, И.А. Архипов // Российский паразитологический журнал. – 2008. – № 4. – С. 109-114.

8. Crouch E., Wright J.R. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – Vol. 63. – P. 521-554.
9. Kishore U., Greenhough T.J., Waters P., Shrive A.K., Ghai R., Kamran M.F., Bernal A.L., Reid K.B., Madan T., Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors // *Mol. Immunol.* – 2006. – Vol. 43. – № 9. – P. 1293-315.
10. Wu H., Kuzmenko A., Wan S., Schaffer L., Weiss A., Fisher J.H., Kim K.S., McCormack F.X. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability // *J. Clin. Invest.* – 2003. – May; 111 (10):1589-602.

Рецензенты:

Шкурат Татьяна Павловна, доктор биологических наук, профессор, директор НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.

Тугуз Аминет Рамазановна, доктор биологических наук, зав. иммуно-генетической лабораторией ФГБОУ ВПО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп.