

**Волгоградский государственный медицинский университет
Волгоградский медицинский научный центр**

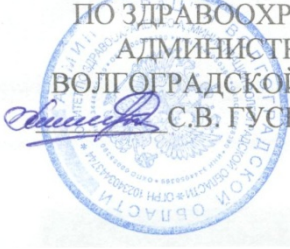
**А.В. Смирнов, Н.В. Григорьева, В.В. Ермилов,
Л.С. Быхалов, М.В. Шмидт**

**ДИАГНОСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕГКИХ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ
ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА**

Методические рекомендации

Волгоград - 2011

«УТВЕРЖДАЮ»
ВРЕМЕННО ИСПОЛНЯЮЩИЙ
ОБЯЗАННОСТИ
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ КОМИТЕТА
ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
АДМИНИСТРАЦИИ
ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
С.В. ГУСЕЙНОВА



УДК618.1:616-091(07)

Рекомендуются комитетом по здравоохранению Администрации Волгоградской области для
врачей- патологоанатомов

Рекомендуются Центральным методическим Советом Волгоградского государственного медицин-
цинского университета в качестве методических рекомендаций для студентов медицинских ву-
зов, обучающихся по дисциплине – патологическая анатомии

Авторский коллектив:

заведующий кафедрой патологической анатомии, д.м.н., доцент А.В. Смирнов,
профессор кафедры судебной медицины, д.м.н., профессор В.В. Ермилов,
профессор кафедры патологической анатомии, д.м.н. Н.В. Григорьева,
старший преподаватель кафедры патологической анатомии, к.м.н. М.В. Шмидт,
ассистент кафедры патологической анатомии, к.м.н. Л. С. Быхалов.

Рецензенты:

Заведующий отделом клинической и экспериментальной хирургии Волгоградского медицинско-
го центра, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии Волгоградского
государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор А.А. Воробьев;
Заведующий кафедрой биологии Волгоградского государственного медицинского университета, доктор
медицинских наук М.В. Черников.

Диагностика морфологических изменений легких при экспериментальном моделировании лихорадки
Западного Нила/А.В. Смирнов, В.В. Ермилов, Н.В. Григорьева, Л.С. Быхалов, М.В. Шмидт. – Волгоград,
2011.- 22с.

Методические рекомендации «Диагностика морфологических изменений легких при экспери-
ментальном моделировании лихорадки Западного Нила» составлены в соответствии с программой по
дисциплине патологическая анатомия в частности по разделу патологии легких. Методические рекомен-
дации «Диагностика морфологических изменений легких при экспериментальном моделировании лихо-
радки Западного Нила» можно использовать при подготовке к практическим занятиям, при самостоя-
тельной работе студентов медицинских вузов факультетов обучающихся по специальности - патологиче-
ская анатомия, на этапе постдипломного образования, в работе патологоанатомического бюро, бюро су-
дебно-медицинской экспертизы.

©Волгоградский государственный медицинский университет,
Волгоградский медицинский научный центр, 2011

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одной из актуальных проблем современной медицины является исследование структурных изменений в организме человека при лихорадке Западного Нила (ЛЗН), что обусловлено возникновением новых штаммов, ростом заболеваемости в России, странах Европы, Азии, Африки, [Львов Д.К. с соавт., 2004; Писарев В.Б. с соавт., 2007; Davis L.E. et al., 2006; Goody R.J., 2008; Siddharthan V., 2009]. Появление многочисленных случаев ЛЗН, начиная с 1999 года, в Западном полушарии резко актуализировали обозначенную проблему [Бутенко А.М., 2007; Petersen L.R., Hayes E.B., 2008; Bataille A. et al., 2009; Levi M.E. et al., 2010]. В последнем десятилетии в южных регионах РФ зарегистрирована крупная вспышка заболеваемости ЛЗН, охватившая в короткий срок значительные группы населения [Львов Д. К. с соавт., 2004; Писарев В.Б. с соавт., 2007]. Антигены вируса Западного Нила (ВЗН) с регулярным постоянством обнаруживаются в пробах комаров и клещей на территории Волгоградской области [Савченко С.Т., Лобанов А.Н., 2007].

Несмотря на превалирование в структуре заболеваемости ЛЗН случаев с поражением ЦНС (около 70-76 %), примерно в 24-30 % случаев заболевание протекает под маской острого лихорадочного состояния с общим интоксикационным синдромом и/или респираторной вирусной инфекции [Писарев В.Б. с соавт., 2002-2007; Львов Д.К., 2004; Григорьева Н.В., 2005; Белик Т.А., 2006; Шмидт М.В., 2006; Глухов В.А., 2009; Shrestha V., 2003; Verma S., Lo Y., 2009]. У пациентов с синдромами иммунного дефицита, при иммуносупрессорной терапии после трансплантации органов (легких, печени, почек) отмечена быстрая манифестация заболевания с высокой летальностью [Costa A.N. et al., 2003; Cushing M.M. et al., 2004; Allain J.P. et al., 2009; Razonable R.R., Eid A.J., 2009].

При исследовании аутопсийного материала умерших пациентов с диагнозом ЛЗН, несмотря на проводимую терапию, выявлялись морфологические признаки менигоэнцефаломиелита, а также различная степень повреждения легких [Григорьева Н.В., 2005; Dai J., Wang P., 2008; Levi M.E. et al., 2010].

Накопленные клинические материалы свидетельствуют об актуальности изучения повреждения органов дыхательной системы при инфицировании вирусом Западного Нила (ВЗН) [Григорьева Н.В., 2005; Айдинов Г.В. с соавт., 2007; Петров В.А., 2007; Черенов И.В. с соавт., 2007; Чучалин А.Г., 2008; Weingartl H.M. et al., 2008]. Особую актуальность имеет поиск адекватных экспериментальных моделей, позволяющих исследовать закономерности морфофункциональных изменений в легких при ЛЗН [Siirin M.T. et al., 2008]. Считается, что наиболее приближена к природному заражению модель подкожного инфицирования ВЗН [Nemeth N.M., 2006; Allain J.P. et al., 2009]. Несмотря на определенный прогресс в исследовании основных механизмов нейротропного и эндотелиотропного действия ВЗН, многие аспекты структурных изменений в легких, от которых зависит уровень газообмена и регулирующих влияний на целый ряд жизненно важных органов и систем организма, до сих пор остаются малоизученными [Писарев В.Б. с соавт., 2007; Traineau R. et al., 2009].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить закономерности морфологических изменений легких в различные периоды инфекционного процесса при экспериментальном моделировании лихорадки Западного Нила.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проводили в условиях лаборатории биологии и индикации арбовирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (заведующий лабораторией профессор А.М. Бутенко).

В работе использовали белых мышей-самцов массой 10 ± 2 г в возрасте 30 суток, которые были заражены вирусом Западного Нила (ВЗН), астраханский штамм (Астр 901) подкожно в разведении 10^{-2} 0,3 мл (50 животных).

Весь экспериментальный материал был разделен на 6 групп: 1 группа – контрольные ложноинфицированные животные, которым подкожно вводили 0,3 мл 0,9% раствора хлорида натрия (10 животных); 2 группа – животные, инфицированные ВЗН и выведенные из эксперимента на 2 сутки (инкубационный период - 10 животных); 3 группа – животные с клиникой ЛЗН, выведенные из эксперимента на 7 сутки (период разгара - 10 животных); 4 группа – животные, с клиникой ЛЗН, умершие в период с 6 по 9 сутки (6 животных); 5 группа – животные с клиникой ЛЗН, выведенные из эксперимента на 14 сутки (период реконвалесценции - 10 животных); 6 группа – животные, инфицированные ВЗН, у которых не отмечалось клинической симптоматики заболевания, выведенные из эксперимента на 14 сутки (4 животных).

После заражения мыши содержались в стандартных лабораторных условиях, с обычным режимом кормления, движения, освещения. При уходе за животными, питании и проведении экспериментов руководствовались базисными нормативными документами: Приказом МЗ №750, Рекомендациями комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздраве России, рекомендациями ВОЗ [Абидов М.Т., 1996; Zutphen L.F. et al., 1993]. Животных забивали в различные периоды заболевания под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Образцы лёгких фиксировали нейтральным 10% формалином в течение 24 часов, с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых блоков. С парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4 - 6 мкм. Их окрашивали по стандартным методикам гематоксилином и эозином, по ван Гизон, по Массону, по Романовскому-Гимзе [Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996; Семченко В.В. с соавт., 2003].

Иммуногистохимическое исследование с целью определения экспрессии антигенов вируса Западного Нила проводили с использованием моноклональных антител предоставленных лабораторией биологии и индикации арбовирусов НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН. Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с высокотемпературной демаскировкой антигенов [Григорьева Н.В., 2005; Белик Т.А., 2006].

Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе «Micros» (Austria) цифровой фотокамерой «Olympus» (Japan).

Для электронно-микроскопического исследования фиксацию кусочков лёгких размером до 1 мм³ производили в течение 12 часов в 4% растворе параформа на 0,1М какодилатном буфере с последующей постфиксацией в течение 3 часов в 1% растворе тетраокси осмия на 0,1М какодилатном буфере (pH=7,4) при температуре +4°C. После промывки в нескольких порциях раствора какодилатного буфера материал подвергали дегидратации в ацетонах возрастающей концентрации и заливали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы толщиной 50-90 нм получали на ультрамикротоме LKB - 8800. Полутонкие эпон-аралдитовые срезы толщиной 1 мкм окрашивали метиленовой синью. Ультратонкие срезы монтировали на медные сетки. После контрастирования в 0,3% растворе цитрата свинца в течение 20 минут срезы изучались в электронном микроскопе Tesla BS-500 при ускоряющем напряжении 60 кВ. Фотодокументирование производили с использованием фотоплёнок «ФТ-40». Электронные микрофото-

граммы изготавливали на фотографической контрастной черно-белой бумаге «Унибром 160 БП».

На срезах легких с помощью системы анализа изображений, программы «Видеотест-Морфо-4» (Россия) определяли такие морфометрические показатели, как: средняя площадь воздушного пространства альвеол легких, средняя площадь ядер респираторных эпителиоцитов, средняя толщина межальвеолярной перегородки, средняя площадь ядер эндотелиоцитов капилляров межальвеолярных перегородок.

Вариационно-статистическую обработку данных (вычисление средней арифметической величины, среднего квадратичного отклонения, доверительный интервал, коэффициент вариации, дисперсию, ошибку репрезентативности для каждого параметра в исследуемых группах животных, сравнение средних значений по критерию Стьюдента) проводили на ЭВМ Intel Core 2 Due с использованием программы STATISTICA 6.0. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки P была меньше 0,05. При проведении регрессионного анализа рассчитывали коэффициент корреляции для нормальных распределений [Гланц С., 1999].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальном моделировании лихорадки Западного Нила (ЛЗН) путём подкожного введения вируса Западного Нила была обнаружена клиническая симптоматика заболевания у лабораторных мышей на 5-6 сутки от момента подкожного инфицирования с последующим уменьшением выраженности неврологической симптоматики на 12-14 сутки. Летальность среди лабораторных животных составила 15%, что согласуется с данными ряда авторов, изучавших лихорадку Западного Нила на других экспериментальных моделях, в которых летальность животных составляла от 30 до 40% [Шмидт М.В., 2006; Белик Т.А., 2006; Bellizzi M.J., 2006], а в человеческой популяции – 1,0-5,5% [Ковтунов А.И. с соавт., 2002], на тер-

ритории Волгоградской области в различные годы в интервале с 1999 по 2006 г. - от 0 до 10,5% [Савченко С.Т. с соавт., 2006]. Соответствие клинических проявлений заболевания, показателей летальности и изменений в ЦНС проявлениям ЛЗН у человека и животных свидетельствует об адекватности выбранной нами экспериментальной модели.

При изучении морфологических изменений в легких при моделировании ЛЗН отмечено появление признаков повреждения респираторных отделов, преимущественно обратимого характера, начиная со вторых суток эксперимента. При этом у всех инфицированных животных клинических проявлений ЛЗН в данный период эксперимента не отмечались, однако были обнаружены начальные признаки повреждения сосудов микроциркуляторного русла, их полнокровия и экссудативного воспаления в виде диапедеза единичных эритроцитов и нейтрофильных лейкоцитов в стенки и просветы альвеол. Полученные результаты светооптического исследования были уточнены с использованием электронной микроскопии, при которой выявлены признаки обратимых ультраструктурных изменений эндотелиоцитов кровеносных капилляров межальвеолярных перегородок, очаговое разрыхление и фрагментация базальной мембраны.

При морфометрическом исследовании животных 2 группы (табл. 1) обнаружено значимое снижение средней площади воздушного пространства альвеол легких на 36,0% ($P < 0,001$) и увеличение средней толщины межальвеолярной перегородки на 9,87% ($P < 0,01$) по сравнению с контролем (группа ложноинфицированных животных). При этом выявлено, что снижение средней площади воздушного пространства альвеол происходит при увеличении доли мелких альвеол 1 типа (менее 110 мкм^2) и мелких альвеол 2 типа. Подобное изменение морфометрических параметров свидетельствует о взаимосвязанных процессах уменьшения площади воздушного пространства респираторных отделов легких и утолщением межальвеолярных перегородок, которое сопровождается с обратимыми изменениями в эпителии альвеол. Обнаруженная морфологическая картина, по нашему мне-

нию, свидетельствует о выраженных изменениях функциональных возможностей легких уже в инкубационном периоде ЛЗН. Подобная точка зрения основана на наблюдениях, демонстрирующих первичное поражение респираторных отделов легких при гематогенном распространении вирусов, в частности арбовирусов, повреждающих респираторные эпителиоциты и другие компоненты аэро-гематического барьера [Черенов И.В. с соавт., 2007; Айдинов Г.В. с соавт., 2007].

При экспериментальном воспроизведении ЛЗН у животных с клиникой лихорадки Западного Нила, выведенных из эксперимента на 7 сутки, при наличии выраженной неврологической симптоматики в легких обнаруживаются морфологические признаки повреждения различных компонентов респираторных отделов. Продемонстрированные выраженные нарушения в сосудах МЦР в подавляющем большинстве случаев сочетались с накоплением в просветах альвеол экссудата, который в 60% случаев носил геморрагический характер. Наличие геморрагического экссудата в альвеолах при ЛЗН, по-видимому, связано с эндотелиотропным повреждающим действием ВЗН, что приводит к развитию синдрома эндотелиальной дисфункции и наблюдается при ряде арбовирусных инфекций [Глухов В.А., 2009; Pasteriner W. et al., 2009]. Ультраструктурные изменения, выявленные в эндотелии капилляров межальвеолярных перегородок, свидетельствуют о наличии признаков обратимых изменений, в первую очередь, внутриклеточного отёке, изменениях со стороны митохондрий.

При экспериментальном воспроизведении ЛЗН у животных с клиникой лихорадки Западного Нила, выведенных из эксперимента на 14 сутки, при уменьшении неврологической симптоматики в легких сохраняются и даже нарастают по сравнению с предыдущим сроком исследования морфологические признаки повреждения различных компонентов респираторных отделов. Выраженность структурных изменений варьирует в различных отделах легких. Характерно наличие признаков значительных ультраструктурных повреждений в эндотелии капилляров межальвеолярных пе-

регородок, что сочетается с нарушениями кровообращения. В респираторных эпителиоцитах степень ультраструктурных изменений, как правило, меньше, что обусловлено преимущественно гематогенным путем распространения вируса ЗН в природных условиях [Львов Д.К. с соавт., 2004] и при использовании данной экспериментальной модели [Глухов В.А., 2009].

Повышение проницаемости сосудистой стенки, диапедез эритроцитов, краевое стояние и диапедез сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитов, обнаруживаемый у умерших животных, мы рассматриваем как проявление острой воспалительной реакции с признаками эндотелиальной дисфункции, которая сопровождается активацией экспрессии лейкоцитарных и эндотелиальных молекул адгезии, продукцией эндотелиоцитами хемокинов, способствующих миграции форменных элементов крови в периваскулярные ткани [Мишнев О.Д. с соавт., 2005; Cercone M.A. et al., 2009], в том числе при вирусных заболеваниях легких [Deng R. et al., 2008].

Обнаруженное на ультраструктурном уровне повреждение эндотелия характеризовалось появлением признаков набухания митохондрий и фокусами внутриклеточного отека, начиная со вторых суток от момента введения ВЗН, что могло способствовать снижению барьерных функций и проявляться образованием серозного экссудата в просветах альвеол. Подобные изменения могут быть связаны с изменением протективных свойств продукта деградации фибрина, белка В β 15-42 (также называемого FX06), реализующего свою функцию через межклеточные контакты эндотелиоцитов, содержащие VE-кадгерин. Значение белка В β 15-42 для регуляции сосудистой проницаемости показано на животных моделях арбовирусных инфекций (лихорадка Денге) [Gröger M. et al., 2009]. Изменение формы эндотелиоцитов («клеточные сокращения») способствуют разрушению межклеточных контактов и ведут к формированию межклеточных щелей, выходу компонентов экссудата [Ukropes J.A. et al., 2000; Dejana E. . et al., 2001; Wojciak-Stothard B. et al., 2001; Konstantoulaki M. et al., 2003 Broman M.T. et al., 2007; Vestweber D., 2008].

В нашем исследовании на электронномикроскопическом уровне показана роль нарушения ультраструктуры базальной мембраны капилляров межальвеолярных перегородок в процессе повреждения и развитии воспалительной реакции в легких при моделировании ЛЗН. Появление признаков разрыхления в инкубационном периоде сменяется очаговой фрагментацией и деструкцией базальной мембраны в период основных проявлений болезни. К 14 суткам от момента инфицирования, которые мы рассматриваем как стадию угасания проявлений болезни при использовании данной экспериментальной модели, происходит уменьшение неврологической симптоматики [Глухов В.А., 2009], в капиллярах межальвеолярных перегородок обнаруживаются истончение, разрыхление и расщепления базальной мембраны. В группе умерших животных выявлены более выраженные ультраструктурные изменения в виде значительного утолщения базальной мембраны с появлением участков значительного разрыхления и фрагментации.

Подобные изменения в ультраструктуре базальной мембраны могут быть связаны с действием протеаз и других ферментов лейкоцитов и альвеолярных макрофагов с одной стороны [Deng R. et al., 2008; Sun J. et al., 2009], а с другой стороны с изменением активности матриксных металлопротеаз, IV типа коллагеназы [Ray J.M., Stetler-Stevenson W.G., 1994; Barillari G. et al., 1999], а также адгезионных, миграционных и инвазивных свойств эндотелиоцитов [Barillari G. et al., 1999], способных под влиянием вирусной инфекции к активации [Toschi E. et al., 2001]. В целом изменения, обнаруженные нами в стенках сосудов микроциркуляторного русла легких, подтверждают, на наш взгляд, высказанное ранее мнение об эндотелиотропном действии ВЗН [Писарев В.Б. с соавт., 2007] и свидетельствуют о его вазопатических эффектах.

В различные сроки нашего эксперимента при подкожном введении ВЗН при иммуногистохимическом исследовании, в т.ч. у умерших животных, обнаружен иммунореактивный материал в эндотелии кровеносных

капилляров легких, мононуклеарных клетках, эпителиоцитах альвеол, а также в эпителии мелких бронхов и бронхиол. Результаты наших исследований подтверждают мнение о клеточном пантропизме вируса Западного Нила у человека, некоторых видов млекопитающих, птиц [Григорьева Н.В., 2005; Глухов В.А., 2009; Tyler J.W. et al., 2003; Wünschmann A. et al., 2004]. В ряде исследований макрофаги рассматриваются как ключевой фактор в патогенезе ЛЗН, способный усилить повреждение эндотелия [Steele K.E. et al., 2000; Ellis A. et al.: 2002].

При изучении респираторных отделов легких у животных различных групп при экспериментальном воспроизведении ЛЗН были обнаружены обратимые и необратимые изменения в респираторном эпителии, наиболее выраженные в группе умерших животных, а также у животных с клиникой лихорадки Западного Нила, выведенных из опыта на 7-14 сутки заболевания. При уменьшении неврологической симптоматики к 14 суткам исследования ультраструктурные признаки повреждения различных компонентов респираторных отделов легких сохранялись и даже нарастали по сравнению с предыдущим сроком исследования. Выраженность структурных изменений варьировала в различных отделах легких. В респираторных эпителиоцитах степень ультраструктурных изменений, как правило, меньше по сравнению с эндотелиоцитами капилляров межальвеолярных перегородок, что, по-видимому, обусловлено гематогенным путем распространения вируса ЗН при использовании данной экспериментальной модели [Глухов В.А., 2009] и характерного для природных условий (Львов Д.К. с соавт., 2004).

Обнаруженные при ультраструктурном исследовании признаки выраженных повреждений респираторных эпителиоцитов, возможно, связаны с действием цитокинов, вырабатываемых альвеолярными макрофагами, лимфоцитами и другими клетками, поскольку считается, что в тяжелых случаях при деструктивной вирусной пневмонии, вызванной, например, вирусом гриппа H5N1, обнаруживается «цитокиновый шторм», рассматри-

ваемый в качестве основной причины деструктивных изменений в легочной ткани [Deng R. et al., 2008; Sun J. et al., 2009; Guo H., Topham D.J., 2010].

Утолщение межальвеолярных перегородок и накопление экссудата в данный период заболевания отражалось в снижении площади воздушного пространства альвеол, происходило значимое изменение ряда количественных морфологических параметров респираторных отделов легких и реснитчатых эпителиоцитов бронхиол (табл. 1,2). Относительная площадь воздушного пространства альвеол значимо снижалась, начиная со вторых суток заболевания (2 группа) на 4,2% ($P>0,05$) по сравнению с контролем на седьмые сутки (3 группа) - на 13,4% ($P<0,01$) и к четырнадцатым суткам (4 группа) - на 32,2% ($P<0,001$). При этом у животных, умерших в период развернутых клинических проявлений ЛЗН (5 группа) относительная площадь воздушного пространства альвеол была резко снижена по сравнению с контролем на 21,0% ($P<0,001$). Лишь у животных, инфицированных ВЗН, у которых отсутствовала неврологическая симптоматика заболевания (6 группа) относительная площадь воздушного пространства альвеол осталась незначимо ниже контрольных цифр на 5,97% ($P>0,05$). Подобная динамика стереометрических параметров при сопоставлении с результатами качественного патоморфологического анализа указывает на прогрессирующее снижение воздушности легочной ткани при ЛЗН, которое максимально выражено у умерших животных и минимально – у животных без неврологической симптоматики заболевания. По-видимому, относительная площадь воздушного пространства альвеол может рассматриваться как один из диагностических критериев состояния респираторных отделов легких при ЛЗН.

Выявленные при проведении регрессионного анализа количественных параметров легких в различные периоды ЛЗН статистически значимые прямые корреляционные связи между динамикой снижения относительной площади воздушного пространства альвеол легких и изменением площади

Таблица 1

**Изменение морфометрических параметров легких мышей
при моделировании ЛЗН**

Морфометрический параметр	Контроль (1 группа)	Сроки эксперимента		
		2 сут (2 группа)	7 сут (3 группа)	14 сут (4 группа)
Площадь воздушно-го пространства альвеол, мкм ²	394,76 ±14,88	252,56 ±9,86***	273,64 ±11,26***	295,77 ±13,17***
Площадь ядер респираторных эпителиоцитов, мкм ²	11,30 ±0,25	11,56 ±0,33	12,26 ±0,34*	10,56 ±0,14**
Толщина межальвеолярной перегородки, мкм	7,30 ±0,16	8,02 ±0,22**	8,68 ±0,19***#	9,15 ±0,23***
Площадь ядер эндотелиоцитов капилляров межальвеолярных перегородок, мкм ²	12,35 ±0,36	11,09 ±0,37*	10,00 ±0,34***#	8,66 ±0,23***###
Относительная площадь воздушно-го пространства альвеол легких, %	48,31 ±4,09	44,07 ±3,73	34,87 ±1,02**	16,06 ±0,68***

Примечание. Здесь и далее: * P < 0,05 по сравнению с контролем, ** P < 0,01 по сравнению с контролем, *** P < 0,001 по сравнению с контролем, # P < 0,05 по сравнению с предыдущей группой, ## P < 0,01 по сравнению с предыдущей группой, ### P < 0,001 по сравнению с предыдущей группой.

Таблица 2

**Изменение морфометрических параметров бронхиол мышей
при моделировании ЛЗН**

Морфометрический параметр	Контроль (1 группа)	Сроки эксперимента		
		2 сут (2 группа)	7 сут (3 группа)	14 сут (4 группа)
Площадь реснитчатых эпителиоцитов, мкм ²	66,12 ±1,90	53,21 ±1,41***	43,27 ±1,72***	63,17 ±2,34
Площадь цитопл. реснитчатых эпителиоцитов, мкм ²	46,40 ±1,92	37,70 ±1,23***	30,60 ±1,62***	49,24 ±2,10
Площадь ядер реснитчатых эпителиоцитов, мкм ²	20,01 ±0,76	15,51 ±0,51***	12,67 ±0,37***	13,93 ±0,37***
Ядерно-цит. отн. реснитчатых эп-тов, число	0,4788 ±0,0373	0,4255 ±0,0174	0,4571 ±0,0262	0,3044 ±0,0151***

ядер эндотелиоцитов капилляров межальвеолярных перегородок ($r=0,960082358910946$) рассматриваются нами как доказательство причинно-следственных связей между изменением структурно-функциональных характеристик эндотелия капилляров межальвеолярных перегородок (наличие ультраструктурных признаков обратимых повреждений эндотелиоцитов, уменьшение площади их ядер), выраженностью экссудативных процессов и снижением воздушности легочной ткани, что, по-видимому, сопровождается как нарушением функции эндотелия, так и нарушением респираторных функций.

Таким образом, на основании результатов собственных исследований, учитывая стадийность морфогенеза изменений в легких при изучении нашей экспериментальной модели ЛЗН [Писарев В.Б. с соавт., 2007], мож-

но заключить, что при подкожном инфицировании (вирус Западного Нила, штамм Астр 901) мышей-самцов морфологические изменения в легких носили стадийный характер, соответствовали периодам инфекционного процесса. Обнаруженные клинические проявления ЛЗН, сопровождались структурными повреждениями со стороны ЦНС [Глухов В.А., 2009], свидетельствующими об адекватности выбранной экспериментальной модели заболевания, а также морфологическими признаками острой экссудативной пневмонии, которые сохранялись вплоть до 14 суток опыта при снижении неврологической симптоматики.

ВЫВОДЫ

1. При моделировании лихорадки Западного Нила путем подкожного инфицирования (вирус Западного Нила, штамм Астр 901) на белых мышатах-самцах выявленные морфологические изменения в легких носили стадийный характер, соответствовали периодам инфекционного процесса, при этом наиболее выраженные признаки обратимых и необратимых, в том числе ультраструктурных повреждений, зарегистрированы на 7-14 сутки экспериментального заражения.

2. При морфологическом исследовании легких в различные периоды лихорадки Западного Нила наиболее выраженные структурные изменения наблюдаются, начиная с 6-7 суток от момента заражения, и характеризуются наличием выраженных признаков экссудативного воспаления у большинства животных. Выявленные обратимые и необратимые ультраструктурные изменения в эндотелии капилляров межальвеолярных перегородок и респираторных эпителиоцитах сочетаются с морфологическими признаками активации альвеолярных макрофагов, усилением экссудативных явлений, нарушением целостности и увеличением толщины межальвеолярных перегородок на 18,8% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем.

3. Комплекс ультраструктурных изменений, выявленных у экспериментальных животных в различных компонентах аэрогематического барьера в инкубационный период и период выраженных клинических проявлений лихорадки Западного Нила свидетельствует о первичном поражении эндотелия кровеносных капилляров межальвеолярных перегородок с последующим повреждением других структурных элементов респираторных отделов легких и развитием экссудативного воспаления.

4. У животных с клиникой лихорадки Западного Нила, выведенных из эксперимента на 14 сутки, обнаруживается различная выраженность ультраструктурных изменений в респираторных отделах легких, в альвеолах в большинстве случаев сохраняется серозно-геморрагический экссудат, дистрофические изменения в респираторных эпителиоцитах, умеренно выраженное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, утолщение межальвеолярных перегородок, сопровождающееся снижением средней площади воздушного пространства альвеол легких на 25,1% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем на фоне прогрессивного увеличения толщины межальвеолярных перегородок на 25,3% ($P < 0,001$), что свидетельствует о сохранении и даже нарастании по сравнению с предыдущим сроком исследования морфологических признаков повреждения различных компонентов респираторных отделов легких, несмотря на уменьшение неврологической симптоматики.

5. При проведении иммуногистохимического исследования с использованием моноклональных антител к вирусу Западного Нила отмечена ядерная и цитоплазматическая экспрессия антигенов вируса Западного Нила, которая была наиболее выражена в альвеолярных макрофагах и эндотелии кровеносных капилляров межальвеолярных перегородок легких в группе животных с клиническими проявлениями заболевания на 7 сутки от момента инфицирования.

6. При моделировании лихорадки Западного Нила путем подкожного заражения летальность среди лабораторных животных на 6-9 сутки заболе-

вания составила 15%. Морфологические изменения в легких в группе умерших животных характеризовались наличием в альвеолах смешанного серозно-геморрагического экссудата, нарушений в микроциркуляторном русле в сочетании с признаками выраженного повреждения компонентов аэро-гематического барьера, снижением абсолютной и относительной площадей воздушного пространства альвеол на 30,1% ($P < 0,001$) и на 27,0% ($P < 0,001$), соответственно, по сравнению с контролем.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные о структурных изменениях в легких при моделировании лихорадки Западного Нила можно использовать в учебном процессе для преподавания патологической анатомии инфекционных болезней, тропической медицины в медицинских высших учебных заведениях, при проведении сертификационных циклов, тематических усовершенствований по специальности патологическая анатомия.

2. Результаты количественного и качественного морфологического анализа с применением иммуногистохимического и электронно-микроскопического методов могут быть рекомендованы к использованию в клинических исследованиях для улучшения качества дифференциальной диагностики лихорадки Западного Нила при патогистологическом изучении биопсийного и аутопсийного материала и для оценки состояния легких при проведении научно-исследовательских работ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абидов М.Т. Новые подходы к созданию адекватной экспериментальной модели сепсиса // Труды 1-го съезда Российского общества патологоанатомов.-М., 1996.-С. 9-10.
2. Айдинов Г.В., Кормиленко И.В., Гайбарян К.С., Москвитина Э.А., Забашта М.В. Эпидемиология лихорадки Западного Нила в Ростовской области // Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции» - Москва, – 2007. – С. 120-121.
3. Белик Т.А. Патоморфологические изменения головного мозга при экспериментальном воспроизведении лихорадки Западного Нила // Автореф. дисс. ...канд. мед. наук.- – Волгоград, 2006.- 23с.
4. Бутенко А.М. Арбовирусы и арбовирусные инфекции: основные события и открытия последних лет // Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции» - Москва, – 2007. – С. 6-14.
5. Григорьева Н.В. Патоморфология органов и систем при лихорадке Западного Нила (клинико-экспериментальное исследование). Автореф. дисс. д-ра мед. наук.- Волгоград, 2005.- 42с.
6. Глухов В.А. Морфофункциональная характеристика межнейронных взаимоотношений в центральной нервной системе при экспериментальном воспроизведении лихорадки Западного Нила // Автореф. дисс. ...канд. мед. наук.- Волгоград, 2009. – 23с.
7. Мишнёв О.Д., Щеголев А.И., Трусов О.А., Свитнева А.М. Эдотоксикоз в хирургической практике // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН и администрации Волгоградской области. – Издательство ВолГМУ. – 2005. - №1. – С. 39-40.
8. Петров В.А. Лечение больных лихорадкой Западного Нила // Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции», Астрахань, 17-20 октября 2006.- Москва, 2007.- С. 204-209.
9. Писарев В.Б., Бутенко А.М., Григорьева Н.В., Петров В.А., Смирнов А.В., Шмидт М.В. Морфологические изменения некоторых органов при лихорадке западного Нила (клинико-экспериментальное исследование) // Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции», Астрахань, 17-20 октября 2006.- Москва, 2007.- С. 221-225.
10. Савченко С.Т., Лобанов А.Н., Краснова Е.М., Лазоренко В.В., Русакова Н.В., Юлин Н.Н., Ерофеев А.Ю. Медико –географическое районирование Волгоградской области по степени риска заболевания лихорадкой Западного Нила // Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные инфекции», Астрахань, 17-20 октября 2006.- Москва, 2007.- С. 161-165.
11. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Руководство по гистологической технике. - М.: Медицина, 1996. - 242 с.
12. Семченко В.В., Барашкова С.А., Артемьев В.Н. Гистологическая техника. – Омск, 2003. – 152 с.
13. Шмидт М.В., Писарев В.Б., Смирнов А.В., Бутенко А.М. Морфологическая реакция астроцитов различных отделов головного мозга мышей при моделировании лихорадки Западного Нила // Архив патологии.- 2006.- Т. 68, №4.-С.25-27.
14. Черенов И.В., Чалов В.В., Галимзянов Х.М., Черенова В.К., Маженова И.З.К вопросу о дифференциальной диагностике Крымской геморрагической лихорадки и лихорадки Западного Нила // Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и научно-практической конференции «Арбовирусы и арбовирусные

инфекции», Астрахань, 17-20 октября 2006.- Москва, 2007.- С. 196-198.

15. Чучалин А.Г. Клинические рекомендации. Пульмонология // Издательство: ГЭОТАР-МЕД.- 2008.-240 с.

16. Allain J.P., Stramer S.L., Carneiro-Proietti A.B., Martins M.L., Lopes da Silva S.N., Ribeiro M., Proietti F.A., Reesink H.W. Transfusion-transmitted infectious diseases // *Biologicals*.- 2009.- Vol.37(2). - P. 71-77.

17. Bataille A., Cunningham A.A., Cedeño V., Patiño L., Constantinou A., Kramer L.D., Goodman S.J. Natural colonization and adaptation of a mosquito species in Galapagos and its implications for disease threats to endemic wildlife // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*.- 2009.- Vol. 106(25). - P. 10230-10235.

18. Barillari G., Sgadari C., Fiorelli V., Samaniego F., Colombini S., Manzari V., Modesti A., Nair B.C., Cafaro A., Ensoli B. The basic and the arginine-glycine-aspartic region of the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein promote growth and locomotion of Kaposi's sarcoma and endothelial cells by retrieving heparin-bound basic fibroblast growth factor and by engaging the Symbol" § 1251 and v3 integrins // *Blood*.- 1999.- Vol. 94.- P. 663-672.

19. Broman M.T., Mehta D., Malik A.B. Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability // *Trends Cardiovasc Med*. -2007.- № 17.-P.151–156.

20. Cercone M.A., Schroeder W., Schomberg S., Carpenter T.C. EphA2 receptor mediates increased vascular permeability in lung injury due to viral infection and hypoxia // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*.- 2009.- Vol.297(5).-P.856-863.

21. Costa A.N., Grossi P., Porta E., Venettoni S., Fehily D. Measures taken to reduce the risk of West Nile virus transmission by transplantation in Italy // *J. Vet. Diagn. Invest*. - 2003. -Vol. 15(4).-P. 324-329.

22. Cushing M.M., Brat D.J., Mosunjac M.I., Hennigar R.A., Jernigan D.B., Lanciotti R., Petersen L.R., Goldsmith C., Rollin P.E., Shieh W.J., Guarner J., Zaki S.R. Fatal West Nile virus encephalitis in a renal transplant recipient. // *Am J Clin Pathol*. - 2004. - Vol. 121(1). - P. 26-31.

23. Davis L.E., DeBiasi R., Goade D.E., Haaland K.Y., Harrington J.A., Harnar J.B., Pergam S.A., King M.K., DeMasters B.K., Tyler K.L. West Nile virus neuroinvasive disease // *Ann. Neurol*.- 2006.- Vol.60(3) . - P.286-300.Dejana E. . et al., 2001

24. Deng R., Lu M., Korteweg C., Gao Z., McNutt M.A., Ye J., Zhang T., Gu J. Distinctly different expression of cytokines and chemokines in the lungs of two H5N1 avian influenza patients // *J. Pathol*.- 2008.- Vol.216, №3.-P.328-336.

25. Ellis A., Gibbs S., Gottdenker N. The role of macrophages in the pathogenesis of West Nile virus infection in birds // *Vet. Pathol*.- 2002.-№39. -P.630-650.

26. Gröger M., Pastener W., Ignatyev G., Matt U., Knapp S., Atrasheuskaya A., Bukin E., Friedl P., Zinkl D., Hofer-Warbinek R., Zacharowski K., Petzelbauer P., Reingruber S. Peptide B β 15-42 Preserves Endothelial Barrier Function in Shock // *PLoS ONE*.- 2009.- Vol. 4, №4.- P. e5391.

27. Guo H., Topham D.J. Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection // *J. Virol*.- 2010.- Vol.84, №15.-P.7750-7759.

28. Konstantoulaki M., Kouklis P., Malik A.B. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*.- 2003.- Vol. 285.- P434–442.

29. Levi M.E., Quan D., Ho J.T., Kleinschmidt-Demasters B.K., Tyler K.L., Grazia T.J. Impact of rituximab-associated B-cell defects on West Nile virus meningoencephalitis in solid organ transplant recipients // *Clin. Transplant*.- 2010.- Vol. 24(2). - P. 223-228.

30. Nemeth N.M., Oesterle P.T., Bowen R.A. Humoral immunity to West Nile virus is long-lasting and protective in the house sparrow (*Passer domesticus*) // *Am. J. Trop. Med*.

Hyg.- 2009.- Vol. 80(5).-P.864-869.

31. Petersen L.R., Hayes E.B. West Nile virus in the Americas // *Med. Clin. North. Am.* – 2008.- Vol.92(6).-P.1307-1322.

32. Razonable R.R., Eid A.J. Viral infections in transplant recipients // *Minerva Med.*- 2009.- Vol.100(6).-P. 479-501.

33. Ray J.M., Stetler-Stevenson W.G. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis // *Eur. Respir. J.* -1994.- Vol.11.- P.2062-2072.

34. Siirin M.T., Travassos da Rosa A.P., Newman P., Weeks-Levy C., Collier B.A., Xiao S.Y., Lieberman M.M., Watts D.M. Evaluation of the efficacy of a recombinant subunit West Nile vaccine in Syrian golden hamsters // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2008.- №79(6).- P. 955-962.

35. Siddharthan V., Wang H., Motter N.E., Hall J.O., Skinner R.D., Skirpstunas R.T, Morrey J.D. Persistent West Nile virus associated with a neurological sequela in hamsters identified by motor unit number estimation // *J. Virol.*- 2009.- Vol.83(9).- P. 4251-4261.

36. Shrestha B., Zhang B., Purtha W.E., Klein R.S., Diamond M.S. Tumor necrosis factor alpha protects against lethal West Nile virus infection by promoting trafficking of mononuclear leukocytes into the central nervous system // *J. Virol.*- 2008.- № 82(18).-P. 8956-64.

37. Steele K.E., Linn M.J., Schoepf R.J., Komar N., Geisbert T.W., Manduca R.M., Calle P.P., Raphael B.L., Clippinger T.L., Larsen T., Smith J., Lanciotti R.S., Panella N.A., McNamara T.S. Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York // *Vet. Pathol.* -2000.- Vol.37(3).-P.208-224.

38. Ukropec J.A., Hollinger M.K., Salva S.M., Woolkalis M.J. SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin.- *J. Biol. Chem.*- 2000.- Vol.275.-P.5983–5986.

39. Toschi E., Barillari G., Sgadari C., Bacigalupo I., Cereseto A., Carlei D., Palladino C., Zietz C., Leone P., Stürzl M., Buttò S., Cafaro A., Monini P., Ensoli B. Activation of matrix-metalloproteinase-2 and membrane-type-1-matrix-metalloproteinase in endothelial cells and induction of vascular permeability in vivo by human immunodeficiency virus-1 Tat protein and basic fibroblast growth factor // *Mol. Biol. Cell.*- 2001.- Vol. 12, №10.- P.2934-2946.

40. Tyler J.W., Turnquist S.E., David A.T., Kleiboeker S.B., Middleton J.R. West Nile virus encephalitis in a sheep // *J. Vet. Intern. Med.*- 2003.- Vol.17(2).-P.242–244.

41. Traineau R., Elghouzzi M.H., Bierling P. Update on infectious risks associated with blood products // *Rev. Prat.* -2009.- Vol.59, №1.-P.86-89.

42. Verma S., Lo Y., Chapagain M., Lum S., Kumar M., Gurjav U., Luo H., Nakatsuka A., Nerurkar V.R. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier // *Virology.*- 2009.- Vol.385,№ 2.-P.425-433.

43. Weingartl H.M., Neufeld J.L., Coppins J., Marszal P. Experimental West Nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*) // *Vet. Pathol.*- 2004.- Vol.41(4).-P.362-370.

44. Wojciak-Stothard B., Potempa S., Eichholtz T., Ridley A.J. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability // *J. Cell. Sci.*- 2001. Vol.114.-P.1343–1355.

45. Wünschmann A., Shivers J., Carroll L., Bender J.J. Pathological and immunohistochemical findings in American crows (*Corvus brachyrhynchos*) naturally infected with West Nile virus // *Vet. Diagn. Invest.*- 2004.- Vol.16(4).-P.329-33.

46. Zutphen L.F., Baumans V., Beynen A.C. Principles of laboratory animal science. - Amsterdam: Elsevier, 1993. - 389 p.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	3
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	5
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	7
4. ВЫВОДЫ.....	16
5. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	18
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
7. СОДЕРЖАНИЕ.....	22

Рекомендуется Центральным методическим Советом
Волгоградского государственного медицинского университета
в качестве учебного пособия для студентов всех факультетов медицинских вузов,
врачей клинических интернов, врачей клинических ординаторов.