

**Latvijas Lauksaimniecības Universitāte**  
Veterinārmedicīnas fakultāte

Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”

**Latvia University of Agriculture**  
Faculty of Veterinary Medicine

Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra”

Mg. med. vet. **Anda Valdovska**

**Pelējuma sēņu skartu ūdeļu parenhimatozo orgānu izpēte  
uz Aleuta slimības fona**

**Examination of mink parenchymal organs affected by moulds on a  
background of Aleutian disease**

Promocijas darba

**KOPSAVILKUMS**

Dr. med. vet. zinātniskā grāda iegūšanai

Veterinārmedicīnas nozarē

Infekcijas slimību un mikrobioloģijas apakšnozarē

**SUMMARY**

of doctoral thesis

for scientific degree Dr.med.vet.

**Sigulda – Rīga - Jelgava**  
**2008**

**Promocijas darbs izstrādāts:**

- LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskajā institūtā “Sīgra”,
- Valsts augu aizsardzības dienesta Augu karantīnas organismu laboratorijas Mikoloģijas nodaļā,
- Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorijā.

Research has been carried out at the:

- Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sīgra”,
- State Plant Protection Service, Plant Quarantine laboratory,
- Institute of Anatomy and Anthropology, Faculty of Medicine, Riga Stradins University.

**Promocijas darba zinātniskie vadītāji:**

Dr. habil. agr., Dr. med. vet., profesors, LZA akadēmiķis

**Aleksandrs Jemeljanovs**

Dr. habil. med., Dr. med., profesore, LZA korespondētājlocekle

**Māra Pilmane**

**Scientific supervisors:**

Dr. habil. agr., Dr. med. vet., professor, full member of the Latvian Academy of Sciences **Aleksandrs Jemeljanovs**

Dr. habil. med., Dr. med., professor, the Corresponding member of the Latvian Academy of Sciences **Māra Pilmane**

**Oficiālie recenzenti:****Officials reviewers:**

LLU VMF Klīniskā institūta asoc.profesore, Dr.med.vet. **Vita Antāne**

RSU Mikrobioloģijas katedras vadītāja, profesore, M.D., Dr.med. **Juta Kroiča**

LLU VMF Preklīniskā institūta profesors, Dr.med.vet. **Arnis Mugurēvičs**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2008.gada 4.jūnijā plkst. 11.00 LLU Veterinārmedicīnas fakultātē Jelgavā, Helmaņa ielā 8, 1. auditorijā.

The defence of the thesis will take place at the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia university of Agriculture on the 4 of June, 2008 at 11:00 o'clock.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā Jelgavā, Lielā ielā 2.

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of agriculture, Lielā street 2, Jelgava.

## SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI .....	4
IEVADS .....	5
MATERIĀLS UN METODIKA.....	7
Eksperimenta kopējā shēma.....	7
Mikoloģiskie izmeklējumi .....	7
Ūdeļu Aleuta slimības diagnostika .....	8
Histoloģisko pētījumu metodes .....	9
TUNEL reakcija.....	9
Biotīna - streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode .....	10
Fluorescences imūnhistoķīmiskā metode .....	10
Datu statistiskā apstrāde.....	11
REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	12
Ūdeļu imūnsistēmas ietekmējošie faktori .....	12
Mikroskopisko sēņu izplatība ūdeļu barībā .....	13
Mikroskopiskās sēnes ūdeļu parenhimatozajos orgānos .....	17
Aknu morfofunkcionālās pārmaiņas.....	21
SECINĀJUMI .....	29
IETEIKUMI .....	29
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES.....	30

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Angliski	Latviski
AAI	Institute of Anatomy and Antropology	Anatomijas un Antropoloģijas institūts
BM	Basement membrane	Bazālā membrāna
ECM	Extracellular matrix	Ekstracelulārā matrice
FGF	Fibroblast growth factor	Fibroblastu augšanas faktors
FGFR	Fibroblast growth factor receptor	Fibroblastu augšanas faktora receptors
Fn	Fibronectin	Fibronektīns
H/E	Hematoxylin/eosin	Hematoksilīns/eozīns
HSC	Hepatic stellate cells	Aknu zvaigžņveida šūnas
HGF	Hepatocyte growth factor	Hepatocītu augšanas faktors
IEOFR	Immunoelectrosmophoresys reaction	Imūnelektrosmoforēzes reakcija
IMH	immunohistochemistry	Imūnhistoķīmija
IL	interleukin	Interleikīns
KVV	Colony forming unit	Koloniju veidojošās vienības
Li	Lymphocytes	Limfocīti
LLU	Latvian University of Agriculture	Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Ln	Laminin	Laminīns
Ma	Macrophages	Makrofāgi
MMP	Matrix metalloproteinase	Matrices metaloproteināze
Ne Lei	Neutrophil leukocytes	Neitrofilie leikocīti
NGF	Nerve growth factor	Nervu augšanas faktors
NGFR	Nerve growth factor receptor	Nervu augšanas faktora receptors
PAS metode	Periodic acid-Schiff method	ŠIK metode
RSU	Riga Stradins University	Rīgas Stradiņa universitāte
TGF-β	Transforming growth factor	Transformējošais augšanas faktors
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors
ZI	Research institute	Zinātnes institūts

# IEVADS

## Darba aktualitāte

Latvijā zvērkopība ir viena no lauksaimniecības nozarēm ar vairāku gadu desmitu darbības pieredzi. Latvijā ar rūpniecisko kažokzvēru audzēšanu šobrīd nodarbojas 14 zvērsaimniecības. Ūdeļu vaislas ganāmpulka attīstības dinamika Latvijā pēdējos gados liecina par pakāpenisku, stabilu pieaugumu. Izaudzēto kucēnu skaits 2005. gadā, salīdzinājumā ar 2004. gadu, ir pieaudzis par 9.03 %, bet 2004. gadā – salīdzinājumā ar 2003. gadu, par 8.36 %.

Lai arī saimniecību ekonomiskie rādītāji liecina, ka Latvijā zvērkopība šobrīd ir veiksmīga un rentabla nozare, tomēr nozīmīgs zvērkopības efektivitātes rādītājs ir iegūto kucēnu skaits. 2003. gadā vidēji no mātes iegūti 3.68 kucēni, 2004. gadā – 3.56 kucēni, bet 2005. gadā 3.88 kucēni. No šiem datiem varam secināt, ka no vienas mātes iegūto kucēnu vidējais skaits izvērtēto 3 gadu laikā ir zems, salīdzinot ar citām valstīm, kas, iespējams, liecina par problēmām kažokzvēru ganāmpulka veselībā.

Ievērojamus zaudējumus nozarei nes plaši izplatītā ūdeļu Aleuta slimība. Diemžēl ne visos ūdeļu ganāmpulkos tās apkarošanas pasākumiem ir pievērsta atbilstoša vērība.

Viens no cēloņiem šo rādītāju nestabilitātei varētu būt dzīvnieku barības līdzekļu piesārņojums un zemā kvalitāte, kas tieši ietekmē ganāmpulka veselību, t.sk., reproduktīvās īpašības. Arī Wenzell un Keil (1980) norāda, ka Vācijā 60% kažokzvēru saslimšanas gadījumu cēlonis ir barības piesārņojums vai kļūdas ēdināšanā. Tādā veidā kažokzvēru turēšanas un ēdināšanas īpatnības – liela dzīvnieku koncentrācija nelielā teritorijā, barības maisījuma sagatavošana uz vietas fermas barības virtuvē, augsts dzīvnieku izcelsmes proteīna un tauku saturs barības maisījumā, termiski neapstrādātu dzīvnieku izcelsmes produktu izmantošana barības maisījuma gatavošanā, dzīvnieku fizioloģiskā nepieciešamība pēc sabalansētas, pilnvērtīgas barības atkarībā no sezonālātes – var sekmēt nosacīti patogēno mikroorganismu, tajā skaitā mikroskopisko sēņu izraisītās saslimšanas dzīvniekiem (Перельдик и др., 1981), īpaši, ja tiem ir samazināta imūnaizsardzība.

Literatūrā (Juokslahti, 1978; 1979) gan ir ziņots par ūdeļu gatavās barības un barības sastāvdaļu bakterioloģiskajiem izmeklējumiem, taču trūkst datu par barības līdzekļu mikoloģisko piesārņojumu un tā ietekmi uz kažokzvēru organismu, tāpēc arī mēs veicām šādu izpēti. Līdz šim Latvijā nav veikti pētījumi par mikroskopisko sēņu klātbūtni ūdeļu barībā un to ietekmi uz dzīvnieku veselību.

Mūsu darba **hipotēzes** pamatā ir pieņēmums, ka, barības līdzekļos, papildus bakterioloģiskajam piesārņojumam, iespējama arī mikroskopisko sēņu klātbūtne, kas, izraisot saslimšanu, rada ūdeļu reproduktīvās sistēmas darbības traucējumus, kavē jauno dzīvnieku attīstību, izsauc paaugstinātu letalitāti un rada būtiskus ekonomiskus zaudējumus. Tāpēc nozīmīga problēma ir ar Aleuta slimības vīrusa skartu ūdeļu un to kucēnu neskaidras etioloģijas slimību un letalitātes izpēte.

Ņemot vērā visu iepriekšminēto, mūsu **darba mērķis** bija noskaidrot pelējuma sēņu izplatību ūdeļu barības līdzekļos un pēc to izēdināšanas noteikt patoloģiskus procesus dzīvnieku parenhimatozajos orgānos uz Aleuta slimības vīrusa fona.

## Darba uzdevumi

1. Izpētīt pelējuma sēņu ģinšu klātbūtni ūdeļu barības līdzekļos.
2. Izpētīt pelējuma sēņu klātbūtni ūdeļu parenhimatozajos orgānos un noteikt to ģintis.
3. Noskaidrot ūdeļu imūnsistēmas aktivitātes pazemināšanās ierosinošos faktoros.
4. Ar imūnhistoķīmisko metožu palīdzību izpētīt Aleuta slimības vīrusa skartu ūdeļu aknu morfoloģiju mikožu gadījumā.

## Darba zinātniskā novitāte

1. Pirmo reizi Latvijā ir izvērtēta ūdeļu barības līdzekļos esošo pelējumsēņu saistība ar Aleuta slimības vīrusa skartu dzīvnieku parenhimatozo orgānu mikoloģisko piesārņojumu.
2. Iegūti jauni dati par patoloģiskajiem procesiem ūdeļu aknās mikožu gadījumā.
3. Pirmo reizi Latvijā veterinārmedicīnā izmantotas jaunākās imūnhistoķīmiskās metodes patoloģisko procesu diagnostikā sekojošā kombinācijā: VEGF, NGFR, MMP2 un MMP9, FGFR, HGF un bazālās membrānas sastāvdaļas - Fn, Lm, IV kolagēns, un iegūti jauni rezultāti hepatopatoloģijā.

## Pētījuma rezultātu aprobācija

Pētījuma rezultāti aprobēti sekojošās starptautiskās zinātniskās konferencēs:

1. RSU Zinātniskā konference. Latvija, Rīga, 2007. gada 29. – 30. marts. *Mikroskopisko sēņu izraisīta iekaisuma ietekme uz ūdeļu aknu bazālo membrānu.*
2. Starptautiskā zinātniskā konference „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna.” Latvija, Jelgava, 2006. gada 10. novembris. *Matrices metaloproteināzes MMP-2 un MMP-9 ūdeļu aknās.*
3. 10th National Congress of Anatomy. Turkey, Bodrum, 6 – 10 September 2006. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Nerve Growth Factor receptor (NGFR) in the mink liver.*
4. 12 International scientific conference „Research for rural development 2006”. Latvia, Jelgava, 17 – 20 May 2006. *Fungi in the mink feed and organs.*
5. 2nd Annual General Meeting. Malta, 3 – 6 May 2006. *Fungi in mink feed and morphopathology of the liver.*
6. Anatomische Gesellschaft – 101st Annual Meeting. Germany, Freiburg, 7 – 10 April 2006. *Mycological contamination of mink feed and it's influence on the morphopathology of internal organs.*
7. Latvijas Ārstu kongress. Latvija, Rīga, 2005. gada 16-18. jūnijs. *Ūdeļu barības līdzekļu patogēno sēņu ietekme uz ūdeļu morfoloģiju.*

**Darba apjoms.** Promocijas darbs noformēts 120 lappusēs un sastāv no: anotācijas, ievada, literatūras apskata, materiāla un metodikas, pētījuma rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, ieteikumiem, pielikuma un izmantotās literatūras saraksta.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījums veikts laika periodā no 2004. gada jūlija līdz 2007. gada aprīlim. Ūdeļu barības paraugu materiālus ieguvām četrās Latvijas Republikas kažokzvēru fermās. Barības līdzekļi mikoloģiskai izmeklēšanai, pēc nejaušas atlases principa, tika ņemti zvērsaimniecību noliktavā un saldētavā - saldētu cūku un liellopu subprodukti (plaušas, balsenes, trahejas, tauki, liellopu priekškuņģi), saldētu zivju subprodukti, hemoglobīna pulveris, kaulu milti, proteīna pulveris, kliju, miežu/kviešu miltu un miežu/kviešu graudi, kā arī gatavās barības paraugi. Kopumā izmeklēti 11 ūdeļu gatavās barības un 32 tās komponentu paraugi.

Mikroskopisko sēņu ietekmes noteikšanai uz ūdeļu organismu, pēc nejaušas atlases principa, izvēlējāmies septiņus mēnešus vecas 18 tumši brūnās ūdeles jaundzīvnieku augšanas un kažoka veidošanās (nobriešanas) periodā, kurām nebija redzamu klīnisku saslimšanas pazīmju. Pēc dzīvnieku parenterālas eitanizācijas (Jepsen et al., 1981) ar 1 ml ditilīna šķīdumu (10 g uz litru ūdens), tiem veicām iekšējo orgānu (aknu, plaušu, nieru) paraugu noņemšanu.

### **Eksperimenta kopējā shēma**

Mikoloģiskai izmeklēšanai izvēlētiem ūdeļu barības komponentiem (n=32) un gatavās barības paraugiem (n=11), kā arī ūdeļu parenhimatozo orgānu paraugiem (n=54) veicām mikoloģiskos uzsējumus uz Sabouraud barotnēm (Willard et al., 1994).

Pirms ūdeļu orgānu ieguves, dzīvniekiem veicām patologanatomisko izmeklēšanu, sekcijai pielietojot Hunter un Lemieux (1996) metodi.

No 18 ūdelēm iegūtie orgānu (aknas, nieres, plaušas) paraugi (0,5 – 1 cm bieži) tika ievietoti arī formalīna šķīdumā (120 g uz litru ūdens) histoloģiskajiem izmeklējumiem, kurus uzglabājam istabas temperatūrā.

Formalīnā glabātos ūdeļu aknu audu gabaliņus ieguldinājam parafīnā. Parafīnā ieslēgtie audu bloki tika sagriezti ar mikrotomu 6 – 7 μm biežumā. Griezumus no mikrotoma ievietojām ūdenī 50 °C temperatūrā un pēc tam novietojām uz tīra un attaukota priekšmetstikliņa. Pagatavotie preparāti tika žāvēti termostatā 56 °C temperatūrā 20 – 60 minūtes (Eurell, Frappier, 2006). Kopumā no 18 ūdeļu aknām pagatavotie 612 histoloģiskie griezumī tika izmantoti 16 dažādām krāsošanas metodēm audu histoloģiskai un imūnhistoķīmiskai izpētei.

### **Mikoloģiskie izmeklējumi**

Ūdeļu barības komponentu un gatavās barības paraugu un atšķaidījumu sērijas pagatavošanu veicām saskaņā ar standartu ISO 7954:1987 „Raugu un pelējuma sēņu skaita noteikšana lopbarībā”. Atšķaidījuma sērijas pagatavošana ietvēra sekojošus posmus. Nosvērām 10 g izmeklējamā parauga un to iebērām kolbā ar sterilu sāls-peptona (kods CM0733, OXOID, Anglija) šķīdumu (9.5 g sausās barotnes izšķīdina 1 l destilēta ūdens) (90 ml). Pēc 15 min. ekstrakcijas Šuteļa aparātā, no sagatavotā sākumparauga paņēmām 1 ml un to ienesām citā sāls-peptona šķīdumā (9 ml), rezultātā veidojot produkta atšķaidījumu 1:100, kā arī 1:1000.

Mikoloģiskajai izmeklēšanai Petri platēs ienesām pa 1 ml barības ekstrakta no katra atšķaidījuma. Pēc tam ielējam 15 – 20 ml izkausētu (un atdzesētu vismaz līdz 45 °C) Sabouraud barotni un uzmanīgi sajaucām.

Ūdeļu parenhimatozo orgānu mikoloģisko uzsēšanu veicām sekojoši - izmainīto audu nelielu virsmu apdedzinājām uz liesmas un ar sterilām grieznēm no to vidus izgriezām audu gabaliņus, ar kuriem veicām svītrveida uzsējumus uz barotnes, vai arī tos izvietojām uz agara virsmas (4 – 5 mazus audu gabaliņus 0.5 cm x 0.5 cm lielumā (LaRocco, 1992; Quinn et al., 1994).

Visi mikoloģiskie uzsējumi Petri platēs audzēti termostatā līdz 4 nedēļām 26 °C temperatūrā (Quinn et al., 1994; Кузнецов, 2001). Izaugušās kolonijas mikroskopējām 5., bet lēnaugušās - 9. dienā un turpmāk pēc vajadzības.

Pelējumsēņu natīvie preparāti tika sagatavoti pēc vispārpieņemtās metodikas – uz priekšmetstikla uzliek 1 pilienu šķīduma natīvo preparātu pagatavošanai (spirts 96° – 20 ml; glicerīns – 40 ml un destilēts ūdens – 40 ml), tajā novieto nedaudz micēlija substrāta un pārklāj ar segstikliņu (LaRocco, 1992).

Katrai identificējamai kultūrai novērtējām makroskopiskās pazīmes – kolonijas virspuses un apakšpuses krāsu, kolonijas faktūru, augšanas ātrumu (gan pēc laika, gan pēc kolonijas diametra). Mikroskopiskās pazīmes balstījās, galvenokārt, uz hīfu septējuma un konidiogēno šūnu tipa raksturojumu (Саркисов и др., 1953; Emmons et al., 1970; Moore-Landecker, 1975; Frey et al., 1985; Kwon-Chung, Bennett, 1992; Bridson, 1993; Larone, 1995; Кириленко, 1997; Ulloa, Hanlin, 2000; Саттон и др., 2001).

### **Ūdeļu Aleuta slimības diagnostika**

Neliela apjoma (līdz 5 ml) asiņu paraugus ūdelēm noņēmām, veicot pakaļkājas pirksta nadziņa nogriešanu (amputāciju) (Jepsen et al., 1981).

Ūdeļu Aleuta slimības diagnostikai izmantojām imūnelektroosmoforēzes reakciju (IEOFR). Saskaņā ar Slugiņa (Слугин, 1984) norādīto, uz tīra, attaukota priekšmetstikliņa (8 x 15 cm) uzlējām 30 ml 1 % karstu agara šķīdumu. Pēc agara gēla sastingšanas ar vakuumsūkni pievienotu caurumotāju tajā izveidoja 204 iedobumus, kuru diametrs ir 2,8 mm, dziļums – 2,5 mm un faktiskais tilpums aptuveni 0,01 ml. Attālums starp blakus esošo iedobumu centriem pa horizontāli bija 6 mm. Imūnelektroosmoforēzes reakcijā izmantojām medināla–veronāla buferšķīdumu ar pH no 8.6 līdz 8.9. Buferšķīduma pagatavošanai 300 ml destilēta ūdens izšķīdināja 10.32 g medināla un pēc tam pievienoja 1.84 g veronāla. Buferšķīdumu ievietoja ūdens vannā pie temperatūras + 40 °C līdz pilnīgai veronāla izšķīšanai. Pēc tam buferšķīdumam pievienoja destilētu ūdeni līdz šķīduma apjoms sasniedza 1 litru.

Kapilāra daļu, kurā atradās ūdeles asins serums, nolauza un ar gumijas caurulītes palīdzību serumu ievadīja attiecīgajā agara gēla iedobumā. Kontroles reakcijai 10. un 12. vertikālās rindas pēdējos iedobumos iepildīja attiecīgi ūdeļu asins pozitīvo un negatīvo serumu. Aleuta slimības antigēnu ar Pastēra pipetes palīdzību iepildīja nepāra rindu iedobumos (arī kontroles rindā).

Šādi sagatavoto priekšmetstikliņu ievietoja elektroforēzes kamerā, ar aprēķinu, lai elektriskā strāva plūstu paralēli horizontālajām iedobumu rindām. Pie priekšmetstikliņa malām piestiprināja 4 - 5 filtrpapīra sloksnītes un to brīvos galus ievietoja vannas nodalījumos ar buferšķīdumu. Elektroforēzes kameru noslēdza ar vāku un pieslēdza to elektriskās strāvas taisngriezim tā, lai “+” pols būtu priekšmetstikliņa labajā pusē. Elektriskās strāvas stiprums bija 10 –15 mA, bet spriegums 220 V.

Pozitīvas reakcijas gadījumā gēlā novēroja taisnu, skaidri izteiktu tievu precipitācijas līniju horizontālajās rindās aptuveni vidū iedobumiem ar ūdeņu asins serumu un antigēnu.

### **Histoloģisko pētījumu metodes**

Kopumā no 18 ūdeņu aknām sagatavotie 612 histoloģiskie griezumumi tika izmantoti krāsošanai morfoloģiskai izpētei ar hematoksilīnu un eozīnu (H & E) (Aughey, Frye, 2001), ar Hotchkiss-McManus periodic acid – Schiff (PAS) ŠIK (Quinn et al., 1994), Perlsa (Cook, 1994) un TUNEL reakcijām (Negoescu et al., 1998), biotīna – streptavidīna imūnhistoķīmisko metodi (Hsu et al., 1981; Эллиниди и др., 2002), kā arī imūnhistoķīmisko fluorescences metodi (Pilmene et al., 1998).

#### **Preparātu krāsošana ar hematoksilīnu un eozīnu**

Pēc preparātu deparafinēšanas, tos 7 minūtes krāsojām ar hematoksilīnu. Pēc tam preparātus 10 minūtes skaloja ūdenī. Sekoja 2 minūšu ilga krāsošana ar eozīnu, pēc kuras preparātus īslaicīgi skaloja ar ūdeni. Krāsošanai sekoja atūdeņošana pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos un ksilolā. Nokrāsotos preparātus noklāja ar polistirolu un nosedza ar segstikliņu.

Krāsošanas rezultātā šūnas bazofilās daļas bija iekrāsojušās zili violetos toņos, bet acidofilās – no rozā līdz tumši sarkanam tonim.

#### **Hotchkiss-McManus periodic acid Schiff (PAS) - ŠIK reakcija**

Pēc preparātu deparafinēšanas, tos 20 minūtes oksidējām ar  $K_2SO_4$  šķīdumu. Pēc tam tos kārtīgi skalojām destilētā ūdenī, kam sekoja 15 minūšu ilga krāsošana ar Šiffa reaģentu. Pēc skalošanas ūdenī preparātu kontrastkrāsošanai (2 minūtes) lietojām hematoksilīnu. Sekoja atkal preparātu skalošana (5 minūtes) ūdenī, dehidratācija pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos un ksilolā, kā arī nokrāsoto preparātu noklāšana ar polistirolu un noseģšana ar segstikliņu.

Krāsošanas rezultātā sēņu elementi nokrāsojas iesārtā krāsā.

#### **Perlsa reakcija**

Pēc preparātu deparafinēšanas, tos 30 minūtes krāsojām ar 2% HCl + 2%  $K_4[Fe(CN)_6]$  maisījumu, kam sekoja skalošana destilētā ūdenī un dehidratācija pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos un ksilolā. Nokrāsotos preparātus apstrādājām ar polistirolu un nosedzām ar segstikliņu.

Krāsošanas rezultātā aknu makrofāgi iekrāsojās elektro zilā krāsā.

### **TUNEL reakcija**

Tika izmantots apoptozes komplekts: *In Situ cell Death Detection*, POD Cat.no.1684817, Roche Diagnostics (Vācija) saskaņā ar Negoescu et al. (1998) aprakstīto tehniku. Deparafinizēti audu gabaliņi 10 minūtes tika turēti istabas temperatūrā PBS (fosfātu buferī) (pH 7,5) šķīdumā. Pēc tam 30 minūtes veica endogēnās peroksidāzes aktivitātes bloķēšanu ar 3% ūdeņraža peroksīdu, tad audu gabaliņus mazgāja (3 x 5 min.) PBS šķīdumā. Audu gabaliņu griezumumi tika ievietoti citrāta buferšķīdumā un ievietoti mikroviļņu krāsnī uz 10 minūtēm, lai fiksētu antigēnu. Pēc tam tos atdzesēja istabas temperatūrā. Pēc tam tos mazgāja PBS šķīdumā un uz 10 minūtēm ievietoja 0,1 % BSA (vērsa seruma albumīnā) uz PBS. Audu griezumus

inkubēja ar TUNEL (Tdt – T gala deoksinukleotidiltransferāzes un dioksigenīna iezīmēto nukleotīdu maisījums) 37 °C tvertnē ar mitrinātu gaisu 60 minūtes ilgi. Pēc skalošanas PBS audu griezumus 37 °C 30 minūtes inkubēja POD (aitas anti fluorescences antivielas ar mārutku peroksidāzi saistītais Fab fragments). Pēc tam griezumus uz 7 minūtēm pārklāja ar DAB (diaminobenzidīna hromogēnu) šķīdumperoksidāzes noteikšanai. Tad audu griezumus noskaloja destilētā ūdenī, kontrastkrāsošanai (20 sek.) lietojām hematoksilīnu un eozīnu. Nokrāsotos preparātus apstrādājām ar polistirolu un nosedzām ar segstikliņu.

### **Biotīna - streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode**

Pielietojot biotīna un streptavidīna imūnhistoķīmisko metodi, noteicām ūdeļu aknu audos vaskulārā endoteliālā augšanas faktora (VEGF, kods M7273, 1:50, DakoCytomation, Dānija), nervu augšanas faktora receptora (NGFR, kods M3507, 1:150, DakoCytomation, Dānija), matricas metaloproteināžu (MMP2 (kods AF902) un MMP9 (kods AF909) (1:100, R&D System, Vācija), fibroblastu augšanas faktora receptora (FGFR, kods ab10646, 1:100, abcam, Anglija), transformējošā augšanas faktora beta (TGF-β, kods T1654, 1:1000, SigmaBioScience, ASV), fibronektīna (Fn, kods A0245, 1:100, trušu Ig, Dako, Dānija), laminīna (Lm, kods 2233PLA, 1:25, Euro-Diagnostika, Dānija), IV kolagēna (kods 2233 PCO, 1:25, Euro-Diagnostika, Dānija), kā arī hepatocītu augšanas faktora (HGF, kods AF294NA, 1:300, R&D System, Vācija) klātbūtni.

Deparafināciju veicām pēc vispārpieņemtās shēmas. Pēc preparātu skalošanas (10 min.) PBS (fosfātu buferis, pH 7.4) šķīdumā, tos ievietojam 4% sālsskābā nātrija citrāta buferšķīdumā mikroviļņu krāsnī uz 20 minūtēm. Pēc atdzesētu preparātu skalošanas ar PBS, uz katra griezuma uzklājam pa 150 µl 3 % ūdeņraža peroksīda (10 min.). Preparātus atkal skalojam destilētā ūdenī un PBS, un tad uz preparātiem uzpilinājam primārās antivielas (piemēram, VEGF utt.) - uz katra griezuma pa 30 µl (eksponēcijas laiks – 2 stundas), kā arī preparātiem uzklājam uz 30 minūtēm LSAB + LINK (ar biotīnu saistītās sekundārās antivielas) (kods K1015, DakoCytomation, Dānija), uz 25 minūtēm uzklājam LSAB + KIT (streptavidīnu, kas saistīts ar enzīmu peroksidāzi) (kods K0690, DakoCytomation, Dānija) un uz 10 minūtēm - DAB (substrāta hromogēnā sistēma) (kods K3468, Dako, Dānija). Pēc tam preparātus īslaicīgi krāsoja hematoksilīnā.

Pozitīvas reakcijas gadījumā vēlamās struktūras nokrāsojās brūnas.

### **Fluorescences imūnhistoķīmiskā metode**

Deparafināciju arī šai reakcijai veicām pēc vispārpieņemtās shēmas. Pēc preparātu apstrādes ar PBS (fosfātu buferis) kopā ar 0,25 % TRITON X – 100 (2,5 ml uz 1 l) vismaz 1 stundu, sekoja audu paraugu (ar uzklātu primāro antivielu Rabbit anti-human (piem., IV kolagēnu, utt.)) inkubēšana ledusskapī ūdens kamerā 18 – 24 stundas ilgi. Pēc sekundāro antivielu Rabbit Ig (kods F0205, Dako, Dānija) uzklāšanas (eksponēcija 2 stundas), preparātus pārklājam ar PBS (fosfātu buferis) + glicerīns (1:1) un uzlikām segstikliņu. Sagatavotos griezumus glabājam saldētavā.

Pielietojot imūnhistoķīmisko fluorescences reakciju, noteicām ūdeļu aknu audos fibronektīna (Fn, kods A0245, 1:200, Dako, Dānija), laminīna (Lm, kods 2233PLA, 1:25, Euro-Diagnostika, Dānija) un IV kolagēna (kods, 2233 PCO, 1:25, Euro-Diagnostika, Dānija) klātbūtni, izmantojot Pilmane et al. (1998) izstrādāto metodi.

## Datu statistiskā apstrāde

Šūnu skaitīšanai tika izmantota kvantitatīvā metode, kad iekaisuma šūnas skaitījām trīs brīvi izvēlētos redzeslaukos ap centrālo aknu vēnu 400 X palielinājumā, bet apoptotiskos hepatocītus – 3 dažādos redzes laukos (Автандилов, 1990; Willard et al., 1994).

Aknu augšanas faktoru, deģenerācijas marķieru, BM komponentu un apoptozes izdales novērtēšanai lietojām pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma puskvantitatīvo skaitīšanas metodi (Pilmane et al., 1998).

Datu apstrādei izmantotas statistikas metodes vidējā lieluma un standartnovirzes aprēķinam, kā arī Stjūdenta t -tests vidējo lielumu salīdzināšanai (Arhipova un Bāliņa, 1999).

Lai pierādītu starpību būtiskumu neparametriskām metodēm, lietots vidējā aritmētiskā reprezentācijas kļūdas aprēķins ar Stjūdenta kritēriju (95 %), kā arī vienfaktora dispersija.

Ar imūnhistoķīmiskajām metodēm iegūto rezultātu izplatības salīdzinājumam lietota relatīvā biežuma aprēķinu modelis (Goša, 2003).

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### Ūdeļu imūnsistēmas ietekmējošie faktori

Kopā ar barību mikroskopiskās sēnes nokļūst arī dzīvnieku gremošanas traktā, tomēr, pateicoties organisma nespecifiskajiem un specifiskajiem aizsargfaktoriem, parasti tās nespēj izraisīt mikozes attīstību. Starp nespecifiskajiem fizioloģiskajiem aizsardzības faktoriem ir paaugstinātā ķermeņa temperatūra. Vairums siltasiņu dzīvniekiem tā ir ap 39 °C, kas ir nelabvēlīga mikroskopisko sēņu attīstībai organismā (Кузнецов, 2001). Tomēr organisma imūndeficīts rada labvēlīgus apstākļus mikozes attīstībai dzīvnieku organismā.

#### Aleuta slimība

Vislielākā problēma zvērsaimniecībām ir ūdeļu Aleuta slimība, kuras ierosinātājs (parvovīruss) vairojas makrofāgos un, nomācot T limfocītu supresorus, veidojas plazmatiskās šūnas (plazmocitoze) (Trubka, 2001). Izmantojot imūnelektroosmoforēzes reakciju (IEOFR) konstatējām, ka 82 % ūdeļu ir Aleuta slimības pozitīvi, un mūsu pētījumā izmantotās ūdeles visas bija parvovīrusa nēsātājas, norādot, ka dzīvniekiem ir imūnsistēmas darbības traucējumi (Слугин, 1984, Ryan, 1994; Brooks et al. 1995). Izveidojušās situācijas dēļ kontrolgrupu ar no parvovīrusa brīvām ūdelēm nav iespējams izveidot ētisku un tautsaimniecībā svarīgu apsvērumu dēļ.

#### Ūdeļu barības izvērtējums

Svarīgs veicinošs faktors mikožu attīstībai ir arī sabalansētas barības izēdināšana dzīvniekiem. Kažokzvēru saimniecībās, kuru dzīvnieku barības paraugus analizējām, gatavās barības sagatavošanai izmantoja kā dzīvnieku (liellopu un cūku subproduktus, asinis, olbaltumvielu koncentrātu, zivis un zivju subproduktus un olas), tā arī augu valsts izcelsmes produktus (miltus, raugu, kāpostus).

Salīdzinot ūdeļu barības devu ar citu autoru (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) norādīto ieteicamo daudzumu atšķirīgiem jaundzīvniekiem jūlija – novembra mēnešos, secinām, ka barības enerģētiskā vērtība – 343 kkal atbilst literatūrā norādītajam par attiecīgā ūdeļu attīstības periodā diennakts fizioloģiskajai nepieciešamībai (230 – 470 kkal).

Sagremojamā proteīna norma ūdeļu barības devas aprēķinos tiek izteikta tā daudzumā (g) uz 100 kkal enerģijas. Atbilstoši literatūras datiem (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) ūdelēm rudens periodā nepieciešami 8.0 – 9.0 g sagremojamā proteīna uz 100 kkal enerģijas. Mūsu pētīto ūdeļu barības devā šis daudzums sastāda 9.0 g sagremojamā proteīna uz 100 kkal enerģijas diennaktī. Tātad atšķirtie ūdeļu kucēni ir atbilstoši savam fizioloģiskās attīstības periodam pilnībā nodrošināti ar tiem nepieciešamo sagremojamo proteīnu.

Analizējot tauku saturu barības devā uz 100 kkal enerģijas, secinām, ka eksperimentālās ūdeles saņēma 4.8 g tauku uz 100 kkal. Autori (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) atšķirīgiem ūdeļu jaundzīvniekiem Baltijas un Skandināvijas reģionos jūlija – novembra mēnešos iesaka 3.2 līdz 4.8 g tauku uz 100 kkal. Tādējādi eksperimentālās ūdeles saņēma maksimālo autoru ieteikto tauku daudzumu. Svarīgi, ka augsts dzīvnieku izcelsmes proteīna un tauku saturs barības maisījumā var sekmēt nosacīti patogēno mikroorganismu izraisītās saslimšanas (Перельдик и др., 1981).

Izvērtējot oglekļa hidratu daudzumu, tie barības devā sastādīja tikai 60 % no fizioloģiski nepieciešamā minimālā apjoma, jo ūdeļu kucēniem periodā no jūlija līdz

novembrim nepieciešams saņemt 5 – 7 g ogļhidrātu uz 100 kkal enerģijas. Aprēķinātais liecina, ka ūdeņu organisms rezultātā nepilnvērtīgi izmanto arī barībā esošo sagremojamo proteīnu un taukus (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985). Noskaidrots, ka ilgstošas ogļhidrātu nepietiekamības apstākļos ūdeļiem veidojas acidoze, dzīvnieki atpaliek savā attīstībā un pasliktinās kažokādu kvalitāte (Берестов, 1985), kā arī acidozes apstākļos dzīvniekiem gremošanas traktā pazeminās vides pH (Маневичс, 1983), kas veicina to rezistences pazemināšanos.

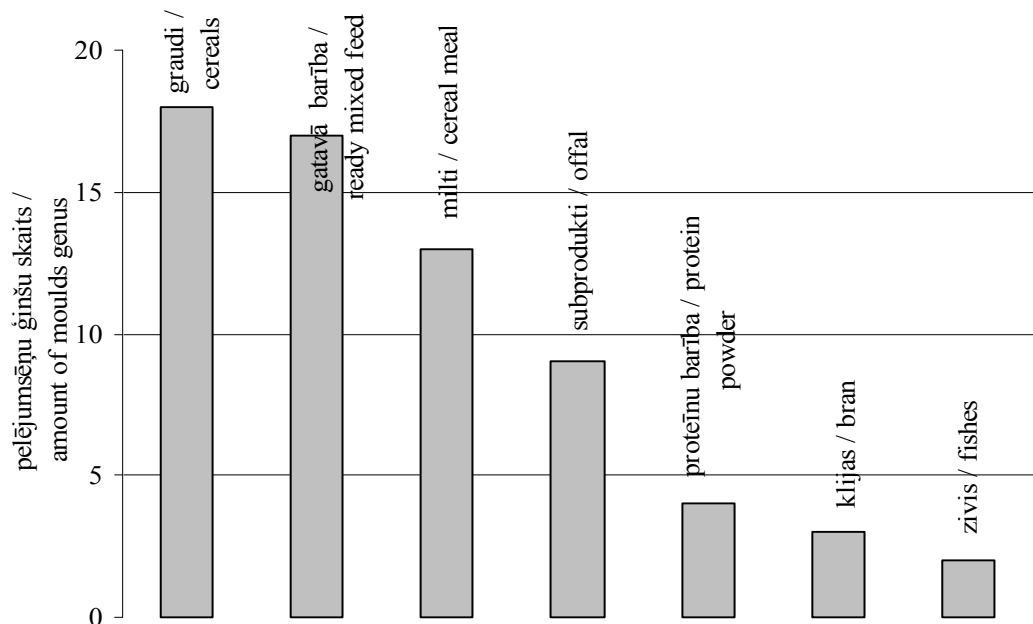
No minētā varam secināt, ka nepieciešama dzīvnieku barības devas korekcija, palielinot tajā ogļhidrātu daudzumu. Autori (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) kā racionālāko ogļhidrātu avotu ūdeļu barībā iesaka vārtus graudaugu miltus.

Ņemot vērā augstākminēto un apzinoties, ka pētījumā iekļautajām ūdeļiem ir spēcīgs imūndeficīts (Слугин, 1984, Ryan, 1994; Brooks et al. 1995), un, balstoties uz pierādījumiem, ka ‘oportunistiskās’ sēnes (kas ir daļa no normālās organisma vai apkārtējās vides mikrobiālās floras) inficē tikai organismu ar izmainītu imūno aizsargmehānismu (Ryan, 1994; Rubin, Farber, 1999), svarīgi bija noskaidrot iespējamo sakarību starp mikozo piesārņojumu barībā un ūdeļu parenhimatozajos orgānos, galveno uzmanību vēršot uz aknu morfoloģiskajām izmaiņām, jo imūnsupresīviem dzīvniekiem var veidoties ģeneralizēts process (Young, 1970; Quinn et al., 1994; Hubalek et al., 1998; Guarro et al., 1999).

### **Mikroskopisko sēņu izplatība ūdeļu barībā** **Distribution of microscopic fungi in mink feed**

Mikroskopiskās sēnes ir eikarioti un tās plaši izplatītas apkārtējā vidē, tādēļ mūsu uzdevums šajā sadaļā bija noskaidrot pelējumsēņu izplatību ūdeļu barībā un tās komponentos un šo sēņu iespējamo izplatību arī ūdeļu orgānos (plaušās un nierēs), bet jo īpaši – aknās.

Pārbaudīto ūdeļu gatavās barības un tās komponentu paraugu mikoloģiskās izmeklēšanas rezultāti (1. att.) uzrādīja to kontamināciju ar mikroskopiskajām sēnēm.



**1. att. Pelējumsēņu skaitliskā daudzveidība ūdeļu barībā**  
**Fig. 1. Amount of moulds in mink feed**

Barībā un to komponentos konstatēto visu 23 pelējuma sēņu ģinšu un sugu izplatība attēlota arī 1. tabulā. Iegūtie rezultāti uzrāda ūdeņu barības līdzekļu un gatavās barības nozīmīgu piesārņojumu ar mikroskopiskajām sēnēm. Visos ūdeņu barības līdzekļu komponentos un arī gatavajā barībā konstatējām *Aspergillus* un *Penicillium* ģintis.

1. tabula / Table 1

**Mikroskopiskās sēnes gatavajā ūdeņu barībā un barības komponentos**  
**Microscopic fungi in ready-mixed mink feed and raw materials**

Mikroskopiskās sēnes / Microscopic fungi	Proteīna pulveris / Protein powder	Graudu milti / Cereal meal	Ģraudi / Cereals	Klijas / Bran	Subprodukti / Offal	Zivju subprodukti / Fish offal	Gatavā barība / Ready-mixed feed
<i>Acremoniella atra</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Alternaria spp.</i>	-	+	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>Candida spp.</i>	-	+	+	+	+	-	+
<i>Chaetomium spp.</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>Cladosporium bantianum</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Coremiella cubispora</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Crysonilia sitophila</i>	-	+	+	-	-	-	-
<i>Curvularia spp.</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Fusarium spp.</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Gliocladium spp.</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Moniliella acetoabutans</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Mortierella spp.</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Mucor spp.</i>	+	+	+	-	-	-	+
<i>Penicillium spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sporothrix cyanescens</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Stemphylium spp.</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Trichophyton terrestre</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>Zygosporium masonii</i>	-	+	+	-	+	-	-
<i>Wangiella spp.</i>	-	-	-	-	+	-	+

Visvairāk (18 no 23) dažādas pelējuma sēņu ģintis un sugas ir konstatētas graudos. Graudos un to izcelsmes produktos (miltos, klijās) konstatētās 17 pelējumsēņu ģintis literatūrā ir aprakstītas kā plaši izplatītas mikroskopiskās sēnes apkārtējā vidē, īpaši augsnē (Емельянов, 1990; Kwon-Chung, Bennett, 1992; Кузнецов, 2001; Саттон и др., 2001). Visbiežāk graudos un graudaugu miltos vienlaikus ar *Penicillium* un *Aspergillus* ģintīm konstatējām arī *Alternaria*, *Cladosporium* un *Fusarium* pārstāvjus. Graudus par vislielāko riska produktu mikoloģiskajam piesārņojumam uzskata arī citi

autori, īpaši izceļot *Alternaria* un *Cladosporium* mikroskopiskās sēnes, jo to sporas ir visizplatītākās vasaras periodā (Саркисов и др., 1953; Pritchard, Muir, 1987; Moss et al., 1989; Samson, 1989; Pereira et al., 2000; Поздеев, 2001). Kopumā ūdeļu barībai paredzēto augu izcelsmes barības līdzekļu (kviešu un miežu graudu un miltu) mikoloģiskās izmeklēšanas rezultāti Latvijā apstiprina literatūrā aprakstītos faktus par mikroskopisko sēņu izplatību minētajā dzīvnieku barības grupā daudzās citās valstīs (Moss et al., 1989; Knudtson, Kirkbrige, 1992; Кузнецов, 2001; Саттон и др., 2001).

Vidēju mikroskopisko sēņu piesārņotību (9 ģintis) eksperimenta laikā konstatējām cūkgaļas subproduktos, kas bija paredzēti ūdeļu ēdināšanā. Kautproduktu iespējamo piesārņojumu ar *Aspergillus*, *Sporothrix*, *Penicillium*, *Trichophyton* un *Candida* mikroskopiskajām sēnēm apstiprina arī Кузнецов (2001) dati. Neraugoties uz to, ka mikroskopisko sēņu sporas spēj attīstīties plašā apkārtējās vides temperatūras diapazonā – no 0 °C līdz 35 °C, arī citi pētnieki, tāpat kā mēs, *Cladosporium* ir konstatējuši sasaldētos gaļas produktos (Moss et al., 1989). Literatūrā nav datu par mūsu konstatēto *Wangiella*, *Zygosporium masonii* un *Stemphylium* ģints izplatību dzīvnieku izcelsmes barības līdzekļos, tomēr iespēja, ka šīs pelējumsēnes ir sistēmisko mikožu izraisītājas, pastāv (Quinn, 1994). Mūsu pētījumā nebija iespējams noteikt, vai *Sporotrix cyanescens* mikroskopiskās sēnes cūku subproduktos nokļuvušas no mikozes skartām cūkām, vai arī, pamatojoties uz autoru (Спесивцева, 1964; Фейер и др., 1966; Кузнецов, 2001) datiem, kuri apraksta *Sporotrix cyanescens* plašo izplatību apkārtējā vidē, cūku subprodukti piesārņoti pēc cūku kaušanas, subproduktu apstrādes, sasaldēšanas, uzglabāšanas vai transportēšanas laikā. Tomēr arī citi pētnieki ziņo par vairāku *Sporotrichum* ģints pārstāvju izolēšanu no dzīvnieku iekšējiem orgāniem (Спесивцева, 1964).

Liellopu un cūku subproduktus no piegādātajiem LR kažokzvēru saimniecības saņem sasmalcinātus un sasaldētus, tādēļ mūsu pētījums neatļāva noteikt, vai mikroskopisko sēņu avots ir ar mikozēm slimi dzīvnieki, vai arī piesārņošana notikusi subproduktu sasmalcināšanas, sasaldēšanas, uzglabāšanas vai transportēšanas laikā neapmierinošu higiēnas apstākļu ietekmē. Zinātniski tomēr iespējama cūku subproduktu kontamināciju ar mikroskopiskajām sēnēm barības apstrādes vai uzglabāšanas laikā (Перельдик и др., 1981).

Piekrastes rajonos otrs nozīmīgākais dzīvnieku olbaltumvielu avots ūdeļu ēdināšanā ir zivis. Ūdeļu gatavās barības sastāvā iekļautajiem zivju subproduktiem pētījuma laikā konstatējām tikai *Aspergillus* un *Penicillium* ģints mikroskopiskās sēnes. Literatūrā gan nav datu par minēto mikroskopisko sēņu izplatību zivju subproduktos, taču pētnieki (Перельдик и др., 1981) norāda, ka piesārņošana ar *Aspergillus* un *Penicillium* iespējama neapmierinošu telpu un aprīkojuma higiēnas apstākļu rezultātā (produktiem nonākot kontaktā ar piesārņotām virsmām). Turpretim citos pētījumos ir konstatēts zvejas produktu piesārņojums ar *Wangiella* mikroskopiskajām sēnēm (Moeller, 2006), kas mūsu izmeklējumu laikā neapstiprinājās.

Sausā hemoglobīna pagatavošanai izmanto termisku apstrādi, tomēr proteīnu pulverī konstatējām 4 mikroskopisko sēņu ģintis, kuru izolēšanu tikai daļēji apstiprina citu autoru pētījumi. *Aspergillus* un *Penicillium* (Перельдик и др., 1981), kā arī *Trichophyton* (Кузнецов, 2001) ģintis ir izolētas no kažokzvēru barības uzglabāšanas laikā noliktavā. Mūsu pētījumos konstatētā *Trichophyton terrestre*, kas ir dermatomikožu izraisītājs dzīvniekiem, norāda uz to, ka šī mikroskopiskā sēne nav inaktivēta dzīvnieku izcelsmes proteīnu termiskās apstrādes laikā proteīnu pulvera ražošanas tehnoloģiskajā procesā. Uzskatam, ka mikoloģiskais piesārņojums proteīnu pulverī radies, galvenokārt, neatbilstošu higiēnas apstākļu dēļ produkta uzglabāšanas vai

transportēšanas laikā. Uz to netieši norāda *Mucor* klātbūtne, jo šī pelējumsēne ir viens no būtiskākajiem noliktavu piesārņotājiem (Саттон и др., 2001).

Pētījuma laikā gatavajā barībā konstatējām 16 ģintis jeb 74 % no visiem barībā un tās komponentos izolētajiem pelējuma sēņu veidiem. Mūsu izmeklējumus apstiprina tikai daži autori, minot, ka ar mikroskopiskajām sēnēm dzīvnieki, tajā skaitā ūdeles, inficējas alimentāri, piemēram, ar *Mortierella* (Carter, Wise, 2004) un *Trichophyton* (Nicmane, 1982; Кузнецов, 2001). Plašo pelējuma sēņu izplatību varētu izskaidrot arī ar tām labvēlīgo vidi, jo zvērsaimniecībās mikroorganismu attīstības ierobežošanai gatavajai barībai pievieno pieskābi, bet tai pašā laikā nodrošinot ideālu vidi pelējumsēņu attīstībai. Optimālais pH pelējumsēņu attīstībai ir 4.5 – 6.5 (Kwon-Chung, Bennett, 1992; Wilm, 2007).

Izanalizējot mikoloģisko piesārņojumu atsevišķajos barības komponentos, jāsecina, ka no graudos un to izcelsmes produktos konstatētām mikroskopiskām sēnēm - 67 %, kā arī no subproduktos konstatētajām – 75 % pelējumsēņu ģinšu izolējām arī ūdeļu gatavā barībā. Tātad sēnītes nav inaktivētas miltu maisījuma termiskās apstrādes laikā 90 °C temperatūrā. Vislielāko izturību uzrādīja *Trichophyton* mikroskopiskā sēne, jo gan proteīna pulveris ražošanas procesā, gan cūku subprodukti ūdeļu gatavās barības sagatavošanas laikā tika termiski apstrādāti, taču tas nebija ietekmējis mikroskopiskās sēnes dzīvotspēju. *Trichophyton* sporu augsto izturību atzīmē arī citi pētnieki (Nicmane, 1982; Кузнецов, 2001). Vairāki autori savos pētījumos arī ir guvuši apstiprinājumu mikroskopisko sēņu sporu izturībai ekstremālos temperatūras apstākļos (Kwon-Chung, Bennett, 1992; Pasarell, McGinnis, 1992; Кузнецов, 2001), tomēr mūsu pētījuma laikā graudos un to izstrādājumos vairākas konstatētās pelējuma sēnes (*Acremonia atra*, *Alternaria* un *Coremiella cubispora*, *Crysonilia sitophila*, *Gliocladium* un *Zygosporium masonii*) bija inaktivētas termiskās apstrādes laikā. Kopumā izolētās mikroskopiskās sēnes uzrāda lielu izturību pret paaugstinātu apkārtējās vides temperatūru. Mūsu novērojumu apstiprina autoru (Кузнецов, 2001; Поздеев, 2001) pētījumi, kuri skaidro, ka izturību sekmē mikroskopisko sēņu īpatnības – polisaharīdus, īpaši hitīnu, saturošs daudzslāņu šūnapvalks un spēja producēt sporas. Vārīšana mikroskopisko sēņu raugveida formas iznīcina 10 - 15 minūšu laikā, mēs tomēr uzskatām, ka, lai pilnībā inaktivētu mikroskopiskās sēnes dzīvnieku barības līdzekļos, nepieciešama to termiskā apstrāde 160 līdz 180 °C temperatūrā vismaz 10 minūtes, jo barības līdzekļos mikroskopisko sēņu izturība pret termisko iedarbību vēl vairāk palielinās dēļ tā, ka micēlijs caurauž barības līdzekļu, īpaši graudu, substrātu (Кузнецов, 2001). Diemžēl mūsu eksperimentos iekļautajās zvērsaimniecībās šāda barības termiskā apstrāde tehniski nebija iespējama.

Izanalizējot mikoloģisko piesārņojumu, novērojām, ka no barības komponentos konstatētajām mikroskopiskajām sēnēm, 74 % izolējām arī ūdeļu gatavajā barībā. Izvērtējot termiskai apstrādei pakļauto komponentu (miltu un cūkgaļas subproduktu) piesārņojumu, konstatējām, ka no 18 graudos un to produktos esošajiem pārstāvjiem gatavajā barībā nonākuši 13 pārstāvji (72 %), bet no subproduktos esošajiem 9 pārstāvjiem gatavajā barībā konstatēti 8 pārstāvji (89 %). Mūsu pētījumi parādīja, ka ūdeļu barības līdzekļi un gatavā barība mikoloģiski uzrāda nozīmīgu piesārņojumu ar mikroskopiskajām sēnēm (konstatētas 23 mikroskopisko sēņu ģintis un sugas), kas kopumā norāda uz to, ka tās spēj adaptēties dažādās vidēs. Šādus secinājumus izdarījuši arī citi pētnieki, apgalvojot, ka pelējumsēņu adaptācija ir atkarīga no tām pieejamā barības substrāta (Braude et al., 1982; Кузнецов, 2001; Carter, Wise, 2004).

**Mikroskopiskās sēnes ūdeļu parenhimatozajos orgānos**  
**Microscopic fungi in parenchymal organs of mink**

Pētnieki (Емельянов, 1990; Carter, Chengappa, 1993; Quinn et al., 1994; Кузнецов, 2001; Carter, Wise, 2004) ir pierādījuši, ka dzīvnieku inficēšanās, galvenokārt, notiek alimentārā ceļā. Par visjutīgākajiem pret pelējušu barību Manevičs (1983) uzskata zirgus, cūkas, putnus un arī kažokzvērus. Sakarības noskaidrošanai starp dzīvnieku barības mikoloģisko piesārņojumu un organisma inficētību, noteicām mikroskopisko sēņu izplatību ūdeļu parenhimatozajos orgānos.

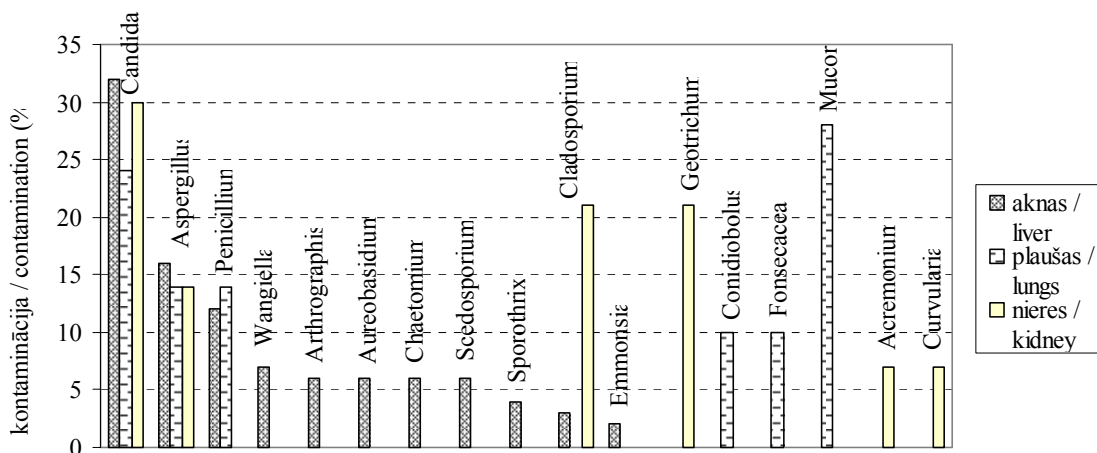
Mikoloģiskā izmeklēšana parādīja plašu ūdeļu orgānu, īpaši aknu, kontamināciju ar pelējuma sēnēm (skat. 2. tab.).

2. tabula / Table 2

**Mikroskopiskās sēnes ūdeļu gatavajā barībā un orgānos**  
**Microscopic fungi in ready-mixed mink feed and in organs**

Mikroskopiskās sēnes / Microscopic fungi	Gatavā barība / Ready-mixed feed	Aknas / Liver	Plaušas / Lungs	Nieres / Kidney
<i>Acremonium spp.</i>	-	-	-	+
<i>Arthrographis kalrae</i>	-	+	-	-
<i>Aspergillus spp.</i>	+	+	+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	-	-
<i>Candida spp.</i>	+	+	+	+
<i>Chaetomium spp.</i>	+	+	-	-
<i>Cladosporium bantianum</i>	+	-	-	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	+	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	+	+	-	-
<i>Conidiobolus coronatus</i>	-	-	+	-
<i>Curvularia spp.</i>	+	-	-	+
<i>Emmonsia spp.</i>	-	+	-	-
<i>Fonsecaea spp.</i>	-	-	+	-
<i>Fusarium spp.</i>	+	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	+
<i>Moniliella acetoabutans</i>	+	-	-	-
<i>Mortierella spp.</i>	+	-	-	-
<i>Mucor spp.</i>	+	-	+	-
<i>Penicillium spp.</i>	+	+	+	-
<i>Scedosporium prolificans</i>	-	+	-	-
<i>Sporothrix cyanescens</i>	+	+	-	-
<i>Stemphylium spp.</i>	+	-	-	-
<i>Trichophyton terrestre</i>	+	-	-	-
<i>Wangiella spp.</i>	+	+	-	-

Pētījumā no aknām izolējām 11, bet no plaušām un nierēm – no katras pa 6 pelējumsēņu pārstāvjiem. Ūdeļu orgānos konstatēto 17 mikroskopisko sēņu ģinšu izplatība attēlota 2. attēlā.



2. att. Mikroskopisko sēņu ģinšu daudzveidība ūdeļu orgānos  
 Fig. 2. Amount of microscopic fungi genus in mink organs

Analizējot ūdeļu orgānu mikoloģiskās izmeklēšanas rezultātus - aknās, nierēs un plaušās konstatētās mikroskopiskās sēnes iedalījām 2 grupās:

1) gatavajā barībā un orgānos konstatētās (*Aspergillus*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sporothrix cyanescens*, *Wangiella*) un

2) ūdeļu orgānos konstatētās, bet no gatavās barības neizolētās, mikroskopiskās sēnes (*Acremonium*, *Arthrographis kalrae*, *Conidiobolus coronatus*, *Emmonsia*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Geotrichum candidum*, *Scedosporium prolificans*).

#### Gatavajā barībā un parenhimatozajos orgānos konstatētās mikroskopiskās sēnes

Pētījuma rezultātā gatavajā barībā un arī visos ūdeļu iekšējos orgānos (kā aknās, tā arī plaušās un nierēs) no 10 sēņu ģintīm konstatējām tikai *Aspergillus* un *Candida* pārstāvjus, kas literatūrā ir minēti kā visbiežākie disseminēto infekciju izraisītāji (Сартон и др., 2001). Atradums raksturo šo ģinšu lielo izturību un spēju pielāgoties apkārtējai videi. Pierādīts, ka *Aspergillus spp.* labi aug temperatūrā virs 55 °C (Tansey, Brock, 1978).

Mūsu pētījuma rezultāta – *Aspergillus spp.* visos izmeklētajos ūdeļu iekšējos orgānos – izplatības iespējamību apstiprina arī vairāki pētnieki, kuri savos pētījumos konstatējuši dzīvnieku aknu, plaušu un nieru piesārņojumu ar *Aspergillus* pēc alimentāras vai aerogēnas inficēšanās (Nicmane, 1982; Myrvik, Weiser, 1988; Carter, Chengappa, 1993; Quinn et al., 1994; Кузнецов, 2001; Carter, Wise, 2004). Literatūrā tomēr trūkst datu par *Aspergillus* ģints izplatību tieši ūdeļu orgānos. Kaut arī plaušās visbiežāk ir sākums aspergilozes attīstībai, tomēr iespējama arī šīs mikozes attīstība alimentārā ceļā (Young, 1970), jo *Aspergillus* ģints infekcija var sākties arī gastrointestinālā trakta gļotādā, radot asiņošanu vai perforāciju, kā arī izmaiņas var radīt gan nierēs un aknās, gan citos orgānos (Young, 1970; Kwon-Chung, Bennett, 1992). Mūsuprāt, šis ģints sēnes plašo izplatību ūdeļu orgānos nodrošina to spēja producēt fermentu (Kwon-Chung, Bennett, 1992). Iegūtie ūdeļu barības līdzekļu pozitīvie mikoloģiskās izmeklēšanas rezultāti attiecībā uz *Aspergillus* ģinti un vienlaicīgi ūdeļu plaušās nenovērotās patoloģiskās izmaiņas, kādas var radīt iepriekšminētā pelējumsēne aerogēnas inficēšanās gadījumā, kopumā norāda uz to, ka inficēšanās notikusi alimentārā ceļā un infekcijas avots ir piesārņota barība.

Mūsu pētījumā konstatētais ūdeļu aknu, plaušu un nieru piesārņojums ar *Candida* ģints sēnītēm sakrīt ar vairāku pētnieku datiem par skartajiem orgāniem

dzīvnieku organismā pēc inficēšanās ar minēto mikroskopisko sēni (Спесивцева, 1964; Braude, 1982; Carter, Chengappa, 1993), tomēr literatūrā nav datu par *Candida spp.* izplatību ūdeļu orgānos. Citiem pētniekiem gremošanas trakts un graudi arī ir bijuši galvenie avoti šīs pelējumsēnes izolēšanā no dzīvniekiem (Kwon-Chung, Bennett, 1992). Neskatoties uz to, ka *Candida spp.* ir daļa no normālās zarnu floras dzīvniekiem, dziļo kandidiāžu gadījumā tomēr kā galvenās infekcijas vietas minētas vispirms barības vads un tad kuņģis (Eras et al., 1972). Patologanatomiski konstatētais enterīts eksperimentālajām ūdelēm sakrīt ar autoru (Спесивцева, 1964; Braude et al., 1982) pētījumiem par *Candida* mikroskopisko sēņu intensīvu vairošanos gremošanas trakta gļotādā imunosupresīviem dzīvniekiem un tai sekojošu iekaisuma attīstību. *Candida spp.* izolēšana vienlaikus gan no ūdeļu aknām, gan plaušām, gan nierēm ļauj secināt, ka ūdelēm ierosinātājs ir izraisījis ģeneralizētu saslimšanu, ko apstiprina pētnieku darbi par *Candida* izraisītu ģeneralizētu mikozi gaļēdājiem (Macswen et al., 1979; Quinn et al., 1994).

Nedaudz mazāku izplatību, t.i., tikai aknās un plaušās, uzrādīja *Penicillium* ģints sēne. Mūsu rezultātus apstiprina autori, kuri dzīvniekiem ierosinātāju kā saprofītu konstatējuši gļotādās un plaušās (Кузнецов, 2001), kā arī izolējuši ar penicilmikozi slimu suņu aknās (Zanata et al., 2006). Ņemot vērā ūdeļu barības paraugu mikoloģiskās izmeklēšanas rezultātus, kur piesārņojums ar *Penicillium* mikroskopiskajām sēnēm konstatēts visos izmeklētajos paraugos un datus par dzīvnieku inficēšanos ar ierosinātāju alimentārā ceļā (Емельянов, 1990), secinājām, ka *Penicillium* avots varētu būt piesārņotā ūdeļu barība.

Iespējamo *Mucor* mikroskopisko sēņu piesārņojumu ūdeļu plaušās, ko mēs konstatējām savā pētījumā, apstiprina autoru (Спесивцева, 1964; Емельянов, 1990; Кузнецов, 2001) dati par iespējamu alimentāru vai aerogēnu inficēšanās ceļu. Mūsu secinājumu apstiprina Спесивцева (1964), norādot, ka *Mucor* pārstāvji var atrasties dzīvnieku elpošanas orgānos kā saprofīti, neizraisot mikozes attīstību, vai arī saslimšana var noritēt latentā formā.

Vienlaikus gatavajā barībā un nierēs konstatējām tikai 2 pārstāvjus – *Cladosporium bantianum* un *Curvularia*. Lai gan zinātnieki uzskata *Curvularia* kā plaši izplatītu fitopatogēnu, tomēr arī apstiprina, ka tā var radīt disseminētu infekciju (Guarro et al., 1999; Саттон и др., 2001), pētot šī ierosinātāja radītās saslimšanas zirgiem, liellopiem, suņiem un kaķiem (Carter, Chengappa, 1993). Iespējams, ka autoru norādīto patoloģiju trūkums ūdelēm saistīts ar sugas īpatnībām vai imunitātes spraugumu.

Vislielāko pelējumsēņu piesārņojumu grupas ietvaros konstatējām aknās. Bez iepriekš apskatītajām *Aspergillus*, *Candida* un *Penicillium* ģintīm – izolējām vēl citus 5 pārstāvjus (*Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Sporothrix cyanescens* un *Wangiella*). Literatūrā dati par *Aureobasidium pullulans* patogenitāti ir ierobežoti, bet ir novērojumi par tā izraisītu mikožu dermatītu (Pritchard, Muir, 1987). Ādas mikozes un alerģiskas reakcijas spēj izraisīt arī *Chaetomium* mikroskopiskā sēne (Фейер и др., 1968), taču pastāv varbūtība, līdzīgi mūsu konstatējumam, ka tā var būt arī sistēmisko mikožu cēlonis (Саттон и др., 2001).

Arī *Sporothrix cyanescens*, kas ir viens no *Sporotrichum* mikroskopisko sēņu pārstāvjiem, ir dabā plaši izplatīti saprofīti, taču arī citu autoru dati liecina, ka šīs ģints raugveida formas var izdalīt no dzīvnieku orgāniem (Спесивцева, 1964; Фейер и др., 1966; Кузнецов, 2001), jo organismā tās iekļūst caur ādas un gļotādas brūcēm (Спесивцева, 1964).

Pētījums liecina, ka *Wangiella* arī var būt sistēmiskas mikozes izraisītāja, kas sakrīt ar citu pētnieku vērtējumiem, tomēr visbiežāk literatūrā minētas ir šīs

pelējumsēnes izraisītās zemādas mikozes kaķiem, suņiem, zirgiem, liellopiem, kazām un citiem dzīvniekiem (Quinn et al., 1994).

Literatūrā gan nav datu, kas apstiprinātu mūsu pētījumā konstatēto mikroskopisko sēņu ģinšu izolēšanu no ūdeļu iekšējo orgānu audiem, tomēr pētnieki izolējuši *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Candida*, *Sporothrix* un *Geotrichum* no liellopu un cūku iekšējiem orgāniem (Kwon-Chung, Bennett, 1992; Кузнецов, 2001).

#### Ūdeļu parenhimatozajos orgānos konstatētās, bet no gatavās barības neizolētās mikroskopiskās sēnes

No nierēm izolējām tikai 2 pārstāvjus - *Acremonium* un *Geotrichum candidum*. Iespējams, ka *Acremonium* pelējumsēne persistē ūdeļu uroģenitālajā traktā, neizraisot saslimšanu. Šādu apstiprinājumu sniedz arī citi pētnieki, jo tā ir spējīga izraisīt saslimšanas cilvēkiem, neskatoties uz to, ka tiek minēta kā plaši izplatīts piesārņotājs (Саттон и др., 2001).

Otrs no nierēm izolētais pārstāvis - *Geotrichum candidum* – izraisa reti sastopamu saslimšanu (geotrihozi) (Carter, Chengappa, 1993), neskatoties uz to, ka kā saprofīts ir izplatīts augsnē (Myrvik, Weiser, 1988). Mūsu pētījuma laikā šīs mikroskopiskās sēnes atradumu tikai nierēs apstiprina arī citi autori, apgalvojot, ka kaut arī infekcija ir sistēmiska, parasti tomēr skarts ir viens orgāns (Carter, Chengappa, 1993).

Plaušās konstatējām 2 pārstāvjus - *Conidiobolus coronatus*, *Fonsecaea pedrosoi*, kurus neizolējām ūdeļu gatavajā barībā, kas liecina par to iespējamo iekļūšanu organismā aerogēnā ceļā. Mūsu rezultātus apstiprina Carter un Wise (2004), jo inficēšanās var notikt aerogēni ar mikroskopisko sēņu sporām piesārņotiem putekļiem. Minētās sēnes pētnieki raksturo kā izplatītas augsnē (Саттон и др., 2001).

Mūsu rezultātu par *Conidiobolus coronatus* skartiem plaušu audiem apstiprina arī citi pētnieki (Kwon-Chung, Bennett, 1992), kas ziņo, ka ir izolējuši šo mikroskopisko sēni no suņu un zirgu elpošanas sistēmas, kur ierosinātais izraisītājs deguna gļotādas infekcijas.

Aknās konstatētās pelējuma sēnes, kā *Arthrographis kalrae*, *Emmonsia*, *Scedosporium prolificans* - ir apkārtējā vidē plaši izplatītas (Degavre et al., 1997; Hubalek et al., 1998; Ponton et al., 2000; Кузнецов, 2001).

Pētījumā no ūdeļu aknām izolētajam *Arthrographis kalrae*, iespējams, patogenitātes pamatā arī ir spēja augt paaugstinātā temperatūrā. Pētnieki pierādījuši, ka ierosinātajam piemīt spēja augt pie 37 °C un 45 °C (Саттон и др., 2001).

Ūdeļu aknās konstatējām arī *Emmonsia*. Līdzīgus novērojumus ieguvis Hubalek ar līdzautoriem (1998), norādot, ka minētās mikroskopiskās sēnes izplatību sekmē sīkie grauzēji, jo ir šo mikroskopisko sēņu nēsātāji. Iespējams, ka *Emmonsia* nonākusi ūdeļu organismā no grauzēju piesārņotiem sprostu pakaišiem. Tomēr izolētā pārstāvja iespējamību persistēt ūdeļu organismā apstiprina Hubalek ar līdzautoriem (1998), jo ir novērots sēnes dimorfisms.

Līdzīgi augstākminētajam, arī *Scedosporium prolificans* iespēju persistēt ūdeļu aknās apstiprina to spēja augt pie 45 °C (Саттон и др., 2001).

#### Ūdeļu gatavajā barībā konstatētās, bet no parenhimatozajiem orgāniem neizolētās mikroskopiskās sēnes

Analizējot 3. tabulā attēlotos mikoloģiskās izmeklēšanas rezultātus, konstatējām, ka ir pelējumsēnes, kuras izolējām no ūdeļu gatavās barības, bet no parenhimatozajiem orgāniem – nē. Šādu grupu sastāda 6 pārstāvji - *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, *Moniliella*, *Mortierella*, *Stemphylium* un *Trichophyton terrestre*.

Šie pārstāvji literatūrā ir aprakstīti kā bieži sastopami augsnē, uz augiem un gaisā (Саттон и др., 2001). *Trichophyton*, uzņemot perorāli, parasti no asins cirkulācijas nonāk ādā (Trubka, 2000), tādēļ ar ierosinātāja tipisko patogēnēzi var izskaidrot tā neizolēšanu no ūdeļu orgāniem. Pārējiem šīs grupas pārstāvjiem, mūsaprāt, iekļūšanu orgānos aizkavēja dzīvnieku organismā neizveidojusies neitropēnija, kas liecina, ka iekaisušos audos nav pārmērīgs neitrofilu patēriņš (Jemeljanovs Ļ. u.c., 2007). Pētnieki *Fusarium* kā topošo patogēnu ir konstatējuši tikai pacientiem, kuriem ir samazināts neitrofilo leukocītu skaits (Perfect, Schell, 1996). Mūsu pieņēmumu apstiprina arī statistiskā analīze, jo izraisītājs (mikroskopisko sēņu klātbūtne) nebija ietekmējis šo šūnu būtisku pieaugumu vai samazinājumu.

Starp visiem pētījuma rezultātā konstatētajiem mikroskopisko sēņu veidiem 39 % veido *Dematiaceous* grupas sēnes (*Alternaria*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fonsecaea*, *Scedosporium*, *Stemphylium*, *Zygosporium*, *Wangiella*) (Hogan et al., 1996; Ulloa, Hanlin, 2000; Kwon-Chung, Bennett, 1992). Šo mikroskopisko sēņu kopīgā iezīme ir melanīna klātbūtne šūnas apvalkā. Pētnieces (Жданова, Василевская, 1990) pierādījušas, ka melanīna pigmenta klātbūtne būtiski ietekmē šo šūnu izturību pret apkārtējās vides mitruma, temperatūras un saules starojuma ietekmi, kā arī nodrošina dzīvotspēju vidē ar nepietiekamu barības vielu daudzumu. Turklāt organismā tumši pigmentētajām, melanīnu saturošajām mikroskopiskajām sēnēm ir paaugstināta izturība pret organisma imunitātes aizsargfaktoriem. Iespējams, ka tas ir viens no cēloņiem, kādēļ mūsu pētījuma rezultātā no ūdeļu parenhimatozajiem orgāniem izolētajām sēnēm 42 % veido tieši *Dematiaceous* mikroskopiskās sēnes.

Kopumā varam secināt, ka lielākā daļa no izolētajām pelējuma sēnēm bija apkārtējā vidē izplatītas. Tā kā ūdeles bija Aleuta slimības vīrusa nēsātājas, tad tas ir bijis nozīmīgs veicinošs faktors oportunistu iekļuvei parenhimatozajos orgānos.

### **Aknu morfofunkcionālās pārmaiņas Morphofunctional changes of the liver**

Ņemot vērā mikroskopisko sēņu plašo izplatību apkārtējā vidē, no diagnostiskā viedokļa, sekojot pētnieku (Фейер и др., 1968; Жаров и др., 2003) norādījumiem, precīzākam mikozes diagnozes apstiprinājumam izmantojām ūdeļu orgānu (aknu, plaušu un nieru) audiem H/E metodi. Vispārzināms, ka vārtu vēna (*v.porta*) ar *v.mesenterica superior*, *v.mesenterica inferior*, *v.lienalis*, *v.cystica*, *v.gastrica sinistra*, *v.gastrica dextra* un *v.pregastrica* palīdzību savāc asinis no alimentārā kanāla, liesas, žultspūšļa un aizkuņģa dziedzera (Jubb et al., 1993), un tādad pastāv iespēja perorāli uzņemtām mikroskopiskajām sēnēm tālāk nokļūt aknās. Tādēļ turpmākajā pētījumā vēlējamies noskaidrot tikai aknu morfofunkcionālo stāvokli, izmantojot vairākas imūnhistoķīmiskās metodes.

#### **Mikroskopiskās sēnes aknās**

Mikroskopiskās sēnes no gremošanas trakta, izejot cauri specifiskajiem un nespecifiskajiem aizsargmehānismiem, var nokļūt asinsritē. Ņemot vērā, ka no aknām izolējam samērā daudz pelējuma sēņu ģinšu, un arī aknu patologanatomiskā aina tomēr bija variabla, mūsu pētījuma rezultāti sakrīt ar vairāku zinātnieku apgalvojumu, ka mikroskopiskās sēnes var persistēt dzīvnieku iekšējos orgānos bez tipisku klīnisku un patologanatomisku procesu veidošanās (Myrvik, Weiser, 1988; Carter, Wise, 2004).

Morfoloģiski 11 ūdeļu aknu paraugos, kas bija iegūti no aknām ar distrofijas patoloģiskā ainu, konstatējām aknu vēnu lumenā un hepatocītos apaļas ieslēgumveida struktūras, kas atgādināja dimorfo sēņu aizmetņus. Lai arī Lennette ar līdzautoriem (Lennette, et al., 1974) norāda, ka šie ieslēgumi labi krāsojas ar hematoksilīnu, taču H/E metode nav pietiekami selektīva un tāpēc izmantojām specifisko ŠIK metodi, ar kuras palīdzību ūdeļu fiksētajos aknu audos atradām apaļas sēņu raugveida formas un hīfas. Hīfas ūdeļu aknās atradām starp hepatocītiem visās aknu acinusa zonās, taču sēņu raugveida formas, galvenokārt, bija interlobulārajos žultsvados, un tikai nedaudz starp hepatocītiem periportālajā zonā triādes tuvumā un ap centrālo vēnu.

Mikroskopisko sēņu atrašanu perivenulārā zonā var izskaidrot ar venozo asiņu plūsmas īpatnībām aknās, jo vārtu vēna no jauna sadalās venozajos kapilāros, kuri, tālāk saplūstot kopā, veido aknu vēnas (Daugerts u.c., 1978), tādā veidā toksikanti no kuņģa un zarnām var nokļūt arī šajā zonā, bet sēņu konstatāciju periportālajā zonā varam izskaidrot ar datiem (Scherr, Weaver, 1953), ka raugveida formām izdzīvošanai ir nepieciešams skābekļa patēriņš 5 – 6 reizes augstāks nekā attiecīgās sugas micēlija formām.

Mūsu pētījumā iegūtais mikroskopisko sēņu atradums žultsvados sakrīt ar zinātnieku (Jubb et al., 1993) apstiprinājumu, ka mikotiskās infekcijas bieži invadē žultsvados, un pie tam, vienlaicīgi ierosinātājus var nekonstatēt ne asinīs, ne arī orgānu audos.

Lai arī ar mikoloģiskās izmeklēšanas metodēm konstatējām ļoti daudz pelējumsēņu ģinšu, tomēr ūdeļu aknu audos redzējām samērā maz mikroskopisko sēņu raugveida formu un tikai nedaudz vairāk hīfas, taču daži autori (Фейер и др., 1968) norāda, ka jebkura histoloģisko preparātu krāsošanas metode nenodrošina visu audos esošo mikroskopisko sēņu vienmērīgu specifisku nokrāsošanos.

Neskatoties uz to, ka organisma efektoršūnas (neitrofili un makrofāgi) mikožu ierosinātājus samērā viegli likvidē, tomēr organismā iekļuvušajām mikroskopiskajām sēnēm piemīt spēja kavēt fagocītu intracelulāro iznīcināšanu. Ūdeļu fiksētajos aknu audos raugveida formu klātbūtne norāda uz procesa disemināciju un iespējamu mikozes diagnozes uzstādīšanu. Mūsu novērojumu apstiprina pētnieku secinājumi, ka oportūniskās mikozes izraisa saslimšanu tikai organismā ar novājinātu imunitāti un, pie tam, spēcīga imūndeficīta gadījumā novēro jauktu mikozi, kuru izraisisjušas vairākas mikroskopisko sēņu sugas (Фейер и др., 1968; Rubin, Farber, 1999).

Sēņu saprofitiskai kolonizācijai un tālākai izplatībai organisma audos, ir nepieciešams šķērsot zarnu gļotādu (McGee et al., 1992). Pētījumā izmantoto ūdeļu patoloģiskajā sekcijā novērojām zarnu gļotādu iekaisumu 67 % gadījumos (12 dzīvniekiem no 18), kas būtiski varēja veicināt ierosinātāju adhēziju (pievienošanos) zarnu gļotādai. Otrs nozīmīgs faktors, kas varēja veicināt sēņu iekļūšanu asinsritē – ir mutes, barības vada vai zarnu gļotādu mehāniskie bojājumi, kuru cēlonis ir aso kaulu daļu klātbūtne ūdeļu gatavajā barībā. Līdzīgu secinājumu sniedz citi pētnieki, ka gastrointestinālā trakta sieniņu mikotiskā invāzija ir plaši izplatīta sekas daudzām slimībām, un ievainojums, kas skar gļotādu, var būt nopietns cēlonis sistēmiskai infekcijai (Jubb et al., 1993; Ponton et al., 2000; Кузнецов, 2001; Xi et al., 2004). Mūsaprāt, mutes dobuma un gremošanas trakta gļotādas bojājumi ir viena no būtiskākajām problēmām zvērsaimniecībās, jo tos viegli var radīt esošās asās kaulu daļas dzīvnieku gatavajā barībā. Vēl jo vairāk, jāņem vērā arī ūdeļu mutes dobuma fizioloģiskā īpatnība, t.i., vāji attīstītie dzerokļi, kā rezultātā barību dzīvnieki norij, praktiski to nesasmalcinot (Беспетов, 1985).

## **Iekaisuma šūnu infiltrācija**

Pēc nokļūšanas organismā mikroskopiskās sēnes nonāk saskarē ar fagocītiem un iekaisuma faktoriem (Кузнецов, 2001). Iekaisums ir sarežģīta reakcija, kurā pakāpeniski iesaistās vairāku veidu šūnas. Ūdeļu histoloģiskajos paraugos ap aknu centrālo vēnu tika atrasta ļoti izteikta audu infiltrācija ar makrofāgiem, neitrofilie leukocītiem un limfocītiem, kas rāda, ka ūdeļu aknās vērojams patoloģisks process.

Salīdzinot iekaisuma šūnu izplatību, vislielāko izplatību uzrādīja limfocīti. Starp šūnu daudzumiem pastāv būtiska atšķirība. Mūsu pētīto ūdeļu aknu visos histoloģiskajos paraugos makrofāgi bija 328 šūnas (18.4%), neitrofilie leukocīti – 479 (26.9 %), bet limfocīti – 977 (54.7 %) no šūnu kopējā (t.i., 1784) skaita. Veselos audos neitrofilo leukocītu praktiski nav, tie atrodas asinsritē, tāpēc mūsu pieņēmumu par iekaisuma produktu fagocitozes procesu apstiprina arī Kellers (1991) un McGee et al., (1992). Neitrofilie leukocīti audos liecina par akūtu iekaisuma procesu (McGee et al., 1992). Arī Jubb ar kolēģiem uzsver, ka neitrofilu darbībai ir nozīme mikožu attīstībā (Jubb et al., 1993). Lai arī mūsu pētījumā neitrofilo leukocītu bija par 27.8 % mazāk kā limfocītu, tomēr tas ir nozīmīgs aknu funkcionālā stāvokļa rādītājs. Klatskin un Conn (1993) apstiprina, ka hepatocītu neitrofilu infiltrāciju novēro pie hepatīta un tas liecina par aknu parenhīmas infekciju, un to izvietojums ap triādi ir anormāli.

Aknu paraugos, galvenokārt, novērojām, ka daiviņu arhitektūra ir saglabāta, bet iekaisuma infiltrāts, kas bagāts ar limfocītiem, plešas virzienā no portālā trakta uz blakus esošo parenhīmu, kas liecina par patoloģiskiem procesiem. Tā kā parasti ap triādi atrod tikai dažus limfocītus (Klatskin, Conn, 1993), tad autori (Macswen et al., 1979) šādu ainu raksturo kā hronisku aktīvu hepatītu, bez noslieces uz aknu nekrozi, taču dažos paraugos tomēr iekaisuma infiltrācija bija redzama visās parenhīmas daļās, neietverot tikai portālās vai periportālās daļas. Šādu ainu autori (Macswen et al., 1979) raksturo kā hronisku aktīvu hepatītu ar noslieci uz aknu nekrozi. Mūsu eksperimenta ūdeļu aknu histoloģiskajos paraugos pa retam konstatējām limfocītu infiltrātus arī ap centrālām vēnām. Limfocītu infiltrācija liecina par iekaisuma procesu perēklī un raksturo reakciju, ko izraisījusi mikoloģiskas dabas infekcija (Willard et al., 1994).

Lai arī Kupfera šūnas visbiežāk ir atrodamas acinusa pirmajā zonā (Young, Heath, 2000; Ross et al., 2003; Young et al., 2006), tomēr mēs aknu audu paraugos šo šūnu infiltrāciju konstatējām ne tikai ap portālajiem traktiem, bet arī ap centrālo vēnu. Tas sakrīt ar zonām, kur atradām mikroskopisko sēņu raugveida formas. Kupfera šūnu infiltrācija veidojas vēlākajās iekaisuma fāzēs un raksturo organisma imunitātes spraigumu. Turklāt hroniska iekaisuma gadījumā makrofāgi iekaisušajos audos aktivējas (Kellers, 1991), un ar T šūnu starpniecību aktivētie makrofāgi ir iesaistīti mikrozes samazināšanā (Jubb et al., 1993). Arī citi autori (McGee et al., 1992) norāda, ka mūsu konstatētajam līdzīgs Kupfera šūnu izvietojums kopumā var būt aknu raksturīga reakcija uz mikroskopisko sēņu izraisītu infekciju organismā.

## **Fibroblastu augšanas faktora receptors (FGFR)**

Izvērtējot iepriekšējā sadaļā novēroto iekaisuma šūnu sadalījumu, atklāts paliek jautājums par iekaisuma procesa gaitu, kuras viens no raksturotājiem ir FGFR aktivitāte. Hroniska iekaisuma rezultātā notiek izmaiņas FGF (fibroblastu augšanas faktora) ražošanā vai atbrīvošanā, tātad notiek arī izmaiņas FGFR ekspresijas daudzumā un/vai aktivitātē (Thomson, Lotze, 2003).

Veicot FGFR1 izpēti eksperimentā iekļauto ūdeļu aknās, tos atradām limfocītos un makrofāgos, tādējādi mūsu atradums sakrīt ar datiem par to, ka augstas un zemas aktivitātes FGF receptori atrodas šūnās un komplekss FGF/FGFR izvietojas šūnas kodolā (Thomson, Lotze, 2003). Tā kā FGFR ir iesaistīts ECM degradācijas kontrolē,

FGFR ekspresijas līmenis tieši proporcionāli ietekmē šūnu proliferāciju un migrāciju, tad mūsu pētījuma rezultāti liecina par iekaisuma šūnu proliferatīvo procesu, pie tam, par procesa hronisku gaitu. Lai arī novērotā FGFR1 ekspresija, galvenokārt, periportālajā daļā tomēr raksturo iekaisuma hroniski akūto dabu, tomēr tas apstiprina mikožu izraisīto iekaisumu, jo, ja infekciju izraisījuši fakultatīvi intracelulāri mikroorganismi, organisms var nespēt pilnībā eliminēt antigēnu, patogēnie organismi persistē makrofāgos un izraisa hronisku iekaisumu (Kellers, 1991).

### **Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors (VEGF)**

Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors (VEGF), kurš ir pazīstams arī kā vaskulārais permeabilitātes faktors – ir viens no spēcīgākajiem endotēlija caurlaidības regulatoriem (Essser et al., 1998; Rajkumar, 2001; Nolan et al., 2004).

Pētījuma laikā VEGF aktivitātes pieaugumu konstatējām, galvenokārt, periportālajos hepatocītos. Tātad faktors ir kāpinājies aktivitāti aknu zonās, kas bagātīgi apgādātas ar skābekli. Secinājām, ka VEGF veicina sinusoidālo endoteliālo šūnu un hepatocītu proliferāciju. Konstatētais sakrīt ar citiem pētījumiem (Taniguchi et al., 2001; Shimizu et al., 2005), kaut gan ir arī pretēji dati (Shimizu et al., 2005; Hironobu et al., 2006; Osada et al., 2006; Tsuchihashi et al., 2006), ka tikai hipoksija stimulē VEGF ekspresiju. VEGF atradumam periportālajā daļā izskaidrojumu varētu dot arī tas, ka šajā zonā atradām arī Kupfera šūnas, kuras spēj nozīmīgi ierosināt minētā proteīna sintēzi (Taniguchi et al., 2001).

VEGF tika konstatēts arī aknu asinsvados. Svarīgi, ka faktora darbības rezultātā veidojas asinsvadu sairums, palielinās asinsvadu caurlaidība un attīstās iekaisuma process (Essser et al., 1998; Taniguchi et al., 2001).

Neskatoties uz to, ka VEGF producē vairāki šūnu veidi, ieskaitot makrofāgus, trombocītus, laicocītus, polimorfonukleāros neitrofilus (Thomson, Lotze, 2003; Coenjaerts et al., 2004), mūsu pētījumā neapstiprinājās pozitīva sakarība starp iekaisuma šūnām un VEGF ekspresijas intensitāti. Tas liecina, ka ūdeņu organismā ir faktors ar VEGF aktivitāti bloķējošu darbību. Izrādās, ka *Parvoviridae* dzimtas vīrusi (tātad arī Aleuta vīruss) ir ar onkosupresīvu darbību un bloķē VEGF aktivitāti (Blechacz, Russell, 2004).

Ūdeņu aknu paraugos novērojām sakarību - ja aknās ir tikai daži apoptotiski hepatocīti, tad VEGF izplatība ir būtiska. Tas pierāda, ka VEGF pieauguma rezultātā tiek sekmēta orgāna atbilde uz bojājumu un ir saistīta ar sinusoīdu homeostāzes uzturēšanu aknu distrofijas laikā. Kopumā VEGF aktivitātes pieaugums periportālajos hepatocītos dzīvniekiem ar uzsākušos apoptozi norāda uz iespējamu šī augšanas faktora antiapoptotisku lomu, kas sakrīt ar citiem autoriem (Ueda et al., 2006).

### **Nervu augšanas faktora receptors p75 (NGFR)**

Kupfera šūnām ir būtiska nozīme organisma aizsardzībā (Laskin, 1990), taču gan aktivētas šīs šūnas, gan komponenti, ko atbrīvo infiltratīvie neitrofili, bojātās šūnas, piemēram, apoptisko šūnu peroksīdi, metabolīti un brīvie radikāļi ( $H_2O_2$  vai NO), arī mikroskopisko sēņu metabolīti, kuru rezultātā notiek aknu makrofāgu aktivācija, kopumā ir izšķiroši aknu zvaigžņveida šūnu (HSC) aktivācijai, kas var izraisīt aknu fibrozi un hepatocītu apoptozi (Laskin, 1990; Maher, 1999; Tsukamoto, 1999; Wu et al., 1999; Oakley et al., 2003; Friedman, 2005). Fibrotisku bojājumu laikā hepatocīti ekspresē NGF (jeb neirotropīnu) (Oakley et al., 2003), taču NGF darbības efektivitāti paaugstina arī NGFR p75 no aktivētām aknu zvaigžņveida šūnām (Rubin, Farber, 1999; Wu, Zern, 2000; Trim et al., 2000; Passino et al., 2007).

Pētījuma rezultāti demonstrēja vidēju aknu zvaigžņveida šūnu daudzumu, kas korelēja ar aktivizēto hepatocītu apoptozi. Novērotais liecina par aknu atbildes reakciju uz bojājumu. Pētnieki arī konstatējuši, ka galvenā iezīme reģenerācijas procesam ir aktivēto HSC apoptoze (Issa et al., 2001). Mēs secinājām (līdzīgi Oakley et al., 2003), ka nervu augšanas faktora receptors (NGFR p75) izdalās no hepatocītiem aknu bojājumu laikā un ir saistīts ar zvaigžņveida makrofāgu (HSC) apoptozi, taču NGFR izpausme nav būtiska aknu apoptozes laikā, kas, iespējams, ir HSC adaptīva kompensējoša atbilde ne tikai uz pašu apoptozi, bet arī uz iekaisumu un/ vai distrofiju, par ko liecina NGFR ekspresija vairāk ap žultsvadiem un periportālā daļā.

### **Hepatocītu augšanas faktors (HGF)**

Pētnieki secinājuši, ka HGF nav veselos hepatocītos (Defrances et al., 1992; Miyazawa et al., 1996; Ishikawa et al., 2001), jo atrodas neaktīvā formā, taču aknu kairinājuma vai bojājuma gadījumā transformējas aktīvā formā (Ljubimova et al., 1997; Hiroshi, Toshikazu, 2003; Watanabe et al., 2003). HGF ekspresiju novērojām pilnīgi visos ūdeļu aknu paraugos. HGF izdale, galvenokārt, bija vērojama hepatocītos vienmērīgi vai perēkļveidīgi vairāk ap žultsvadiem un portālajiem traktiem. Minētā faktora nelielu klātbūtni konstatējām arī asinsvadu (interlobulāro vēnu) endoteliocītos, t.i., neparenhīmas šūnās. Mūsu pētījumā novēroto HGF ekspresiju, galvenokārt, hepatocītos apstiprina arī citu autoru iegūtie rezultāti (Rajkumar, 2001; Thomson, Lotze, 2003). Turklāt, augšanas faktora konstatētā izkliede vairāk ap žultsvadiem un portālajiem traktiem, sakrīt ar zonām, kur biežāk konstatējām iekaisuma šūnu un sēņu raugveida formu klātbūtni. Novērotais liecina, ka HGF darbojas kā faktors, kas uzlabo aknu reģenerāciju orgāna bojājuma laikā, ko apstiprina citi pētījumi (Sakaguchi et al., 1994; Ljubimova et al., 1997; Ishikawa et al., 2001; Watanabe et al., 2003; Hironobu et al., 2006). To var izskaidrot ar HGF spēju stimulēt ne tikai aknu parenhimatozo šūnu, bet arī biliāro epiteliālo šūnu proliferāciju (Joplin et al., 1992).

Palielināta šūnu apoptoze arī norāda uz orgāna bojājumu. Ūdeļu aknu paraugos novērojām sakarību starp hepatocītu apoptozi un HGF, proti, aknās ar vidēju apoptotisku hepatocītu daudzumu iepriekš minētā augšanas faktora ekspresija bija būtiska, turpretim aknās ar lielu apoptozi – HGF ekspresija bija maza. Šo novēroto sakarību varētu izskaidrot ar molekulu Bag-1, t.i., iespējamo domēnu HGF signalizācijai, jo HGF saistīšanās ar c-Met receptoru izraisa tirozīna kināzes aktivāciju un šīs tirozīnes fosforilēšanos papildina intracelulāras signālmolekulas. Pierādīts, ka Bag-1 tieši ir atbildīgs par hepatocītu augšanas faktora antiapoptotisko aktivitāti (Funakoshi, Nakamura, 2003).

### **Aknu struktūru bazālās membrānas**

Matrices metaloproteināžu galvenā funkcija ir ekstracelulārās matrices (ECM) komponentu degradācija (Sasaki, Takahara, 1995; Arthur, 1997, Friedman, 1999; Alexandrova, Nikolova, 2002; Hanumegowda et al., 2003), taču IV tipa kolagēns un laminīns atrodas arī bazālajā membrānā (McGee et al., 1992; Eurell, Frappier, 2006), t.sk., asinsvados.

Pētījumā ūdeļu aknās laminīnu, IV tipa kolagēnu un fibronektīnu konstatējām fragmentāri (asinsvadu sienā atsevišķus posmus), vāji izteikti un, galvenokārt, tikai asinsvadu kapilāros. Žultsvados un lielajos asinsvados tos nekonstatējām. Tas norāda uz bazālās membrānas caurlaidības palielināšanos un samazinātu asinsvadu aizsargbarjeru. Tādējādi tas nodrošina pazeminātus imūnās aizsardzības apstākļus (Клишо и др., 2005; Brown et al., 2006).

Bazālās membrānas komponenti pētījumā izmantoto ūdeļu aknās praktiski nebija izteiktas matricēs metaloproteināžu ekspresijas gadījumā, kas liecina par nozīmīgu iekaisuma procesu. To apstiprina pētījumi, ka iekaisuma šūnām, īpaši makrofāgiem, piemīt spēja aktīvi sintezēt, uzkrāt un izdalīt IV tipa kolagenāzes MMP-2 un MMP-9 (Birkedal–Hansen, 1993; Hanumegowda et al., 2003), kuras lizē bazālo membrānu komponentus IV tipa kolagēnu un laminīnu, kā arī proteoglikānus, želatīnus, elastīnu un fibronektīnu (Twining, 1994). Par metaloproteināzes iespējamo ietekmi uz bazālo membrānu komponentiem liecina fakts, ka pētījumā ūdeļu aknās MMP-9 pozitīvās struktūras bieži atradām blakus asinsvadiem.

Nozīmīgs asinsvadu sienīņu bojājumu cēlonis ir arī ūdeļu Aleuta vīruss. Šī vīrusa patogēnēzes pamatā ir spēja veidot asinīs kompleksus (vīruss-antiviela-kompleksus), kuri piestiprinās pie asinsvadu sienīņām, veidojot sakopojumus un izraisa arterītus, kā arī bazālās membrānas izžušanu (Porter et al., 1973; Trubka, 2001).

No augstāk minētā jāsecina, ka ūdeļu aknās esam konstatējuši ļoti nozīmīgus mikožu attīstībai veicinošus faktoros.

### **Matricēs metaloproteināzes (MMP)**

Matricēs metaloproteināzes (MMP) (MMP-2 un MMP-9) ir endopeptidāzes, kuru aktivitāti regulē iekaisuma un imunoloģiskie procesi (Borregaard et al., 1995; Goetzl et al., 1996; Arthur, 2000; Sheu et al., 2001; Hanumegowda et al., 2003; Friedman, 2003; Visse, Nagase, 2003). Pie tam, kolagenāžu paaugstināta aktivitāte ziņota akūtos gadījumos vai arī hronisku aknu bojājumu agrīnās fāzēs (Arthur, 2000; Opendakker et al., 2001). Matriksīnu (MMP) galvenā funkcija ir ekstracelulārās matricēs (ECM) degradācija (Arthur, 1997, Massova et al., 1998; Friedman, 1999; Alexandrova, Nikolova, 2002; Hanumegowda et al., 2003). Sarežģītu ECM satur Disē telpa - IV tipa kolagēnu, laminīnu, proteoglikānus un fibronektīnu (Ingber, 1991; Twining, 1994; Arthur, 1998; Hahn et al., 1980). ECM degradācijas rezultātā ievērojami pavājinās gāzu un vielu apmaiņa starp asinīm un hepatocītiem (Klatskin, Conn, 1993; Young et al., 2006).

Eksperimentā iekļautajām ūdelēm MMP-2 (želatināzes A) izdalošās struktūras aknu daiviņās atradām vienmērīgi un parenhīmā bija vērojama diezgan liela iekaisuma šūnu infiltrācija. Tomēr mums neizdevās novērot MMP-2 korelāciju ar kādu no iekaisuma intensitātes grupām. Tas varētu būt izskaidrojams ar to, ka, lai arī neitrofilie leukocīti ir nozīmīgs reaģējošā skābekļa sugas avots (ROS, t.i., ļoti reaģētspējīgi  $O_2$  metabolīti – peroksīda radikālis  $O_2^-$ , ūdeņraža peroksīds  $H_2O_2$  un hidroksil radikālis HO (Thannickal, Fanburg, 2000)), kas ar peroksīda formu stimulē zvaigžņveida šūnu (HSC) kolagēna sintēzi, tomēr aktivēts neitrofilis producē arī slāpekļa monoksīdu, kurš, tieši otrādi, var samazināt sākotnējo peroksīda izdali šūnās, bloķējot MMP-2 sekrēciju, un samazinot fibrozes veidošanos aknās (Asai, 2006). Uzskata, ka MMP 2 intensitāte ar aknu fibrozes attīstību paaugstinās pakāpeniski. Pie tam, leukocīti aknās iekaisuma laikā var veidot ar Kupfera šūnām spēcīgu savienojumu, kas izmaina zvaigžņveida šūnu darbību (Asai, 2006), tādā veidā samazinot MMP-2 ekspresiju. Tas nozīmē, ka paaugstināta MMP aktivitāte akūtos bojājumos parasti veidojas no iepriekš uzkrāto MMP atbrīvošanas no endotēlijšūnām vai no iekaisuma šūnu pieplūdes un aktivācijas (Benyon, Arthur, 2001). Līdzīgu novērojumu ir ieguvīši arī Arthur (1998), kurš apgalvo, ka želatināze A ir maz veselās aknās, bet dramatiski pieaug aknu slimībās, taču secinājis, ka, fibrozei progresējot, MMP-2 aktivitāte vai nu nav vai arī ir ļoti neliela.

MMP-2 izdalīja makrofāgi un nedaudz arī fibroblasti, kaut gan pētnieki novērojuši, ka MMP producē arī vēl citas iekaisuma šūnas, piemēram, sinusoidālās

endoteliālās šūnas, aktivētas HSC un ļaundabīgo audzēju šūnas, (Birkedal – Hansen, 1993; Hanumegowda et al., 2003; Friedman, 2005).

Izvērtējot MMP-9 ekspresiju ūdeļu aknās, želatināzes B augstāku aktivitāti novērojām 2. apakšgrupai, t.i., ar vidēju daudzumu MMP izdalošām struktūrām un vidēji izteiktu iekaisumu. MMP-9 atradām Kupfera šūnās un nedaudz arī iekaisuma šūnās asinsvados. To varētu izskaidrot ar Kupfera šūnu aktivitāti, kuru infiltrācija veidojas vēlākajās iekaisuma fāzēs un hroniska iekaisuma gadījumā tās iekaisušajos audos aktivējas (Kellers, 1991). Turklāt, aknu zvaigžņveida šūnas (HSC), izdalot MMP-9, papildus veicina Kupfera šūnu darbību (Opdenakker et al., 2001; Friedman, 2003) ar sekojošu ECM degradēšanu un invazīvo procesu turpmāko attīstību (Kanbe et al., 1999; Соловьева и др., 2001). Arī citi autori (Cursio et al., 2002) secina, ka želatināze B ir plaši atrodama iekaisuma šūnās un, īpaši to ekspresē Kupfera šūnas, kurām ir galvenā nozīme aknu bojājumos. Tajā pašā laikā, izanalizējot iekaisuma šūnu strukturālo dalījumu ūdeļu aknās, redzam, ka makrofāgi bija tikai 18,4 %. Tātad pastāv vēl kāds cits faktors, kas varētu veicināt MMP-9 izdalīšanos. Piemēram, tās varētu būt arī proteāzes, neitrofilu atvasināta elastāze, kas ir viens no efektīvākajiem patofizioloģiskajiem MMP-9 aktivatoriem (Ferry et al., 1997).

Pie tam, MMP-9 pozitīvās struktūras bieži bija grupiņās blakus asinsvadiem, kas sakrīt ar citiem pētījumiem, jo aktivētās kolagenāzes lokalizējas bazālās membrānas tuvumā un iedarbojas uz to kolagenolītiski (Hanumegowda et al., 2003).

Statistiski guvām apstiprinājumu, ka iekaisuma šūnu skaita svārstības korelē ar MMP-9 saturošajām šūnām, pie tam, atšķirība ir būtiska. Tātad želatināzes B (MMP-9) koncentrācijas līmenis audos tieši korelē ar iekaisuma procesu, kas sakrīt ar citu pētnieku (Pirilā, 2003; Reif et al., 2005) secinājumiem.

### **Hepatocītu apoptoze**

Apoptoze ir ģenētiski noteikts, iekšējs šūnu bojāejas - pašiznīcināšanās mehānisms, kuru ietekmē dažādi apstākļi (Rubin, Farber, 1999). Hepatocītu bojāejas cēlonis var būt arī mikroorganismu aktivitāte (Klatskin, Conn, 1993). Hazen un Glee (1995) skaidro, ka micēlija elementu vai konīdiju pārvēršanās par viensūnas formu un izplatīšanās organisma audos noved pie vitāli svarīgu audu destrūkcijas. Lai arī autori (Фейер и др., 1968; Поздеев, 2001) uzsver, ka mikroskopiskās sēnes spēj izraisīt orgānu šūnu bojājumus, izmainot metabolismu un šūnu sienīņu struktūru, tomēr mēs pētījuma rezultātā neatradām korelatīvu saikni starp mikroskopisko sēņu ieslēgumu daudzumu un apoptotisko šūnu skaitu, jo 12 – 14 vidējo apoptotisku šūnu daudzumu konstatējām gan, kad izraisītāja ieslēgumu daudzums bija vidējs (+ +), maz (+) vai tos nekonstatējām vispār.

Pētījumā izmantoto ūdeļu aknu paraugos hepatocītu apoptozi novērojām visās parenhīmas daļās, kaut gan fizioloģiski apoptozes process, galvenokārt, notiek centrālās vēnas apvidū, kas nozīmē, ka hepatocīti rodas aknu acinusa 1. (periportālajā) zonā un lēnām migrē uz 3. (centrolobulāro) zonu, kur deģenerējas (Klatskin, Conn, 1993; Green, 1998; Rubin, Farber, 1999). Mūsu pētījumā konstatētās izkaisītās apoptotiskās šūnas, saskaņā ar Klatskin un Conn (1993) datiem, liecina par sistēmisku infekciju, pie tam, tādu, kas ir saistīta ar Kupfera šūnu un dažāda daudzuma neitrofilo leukocītu infiltrāciju.

Viens no hepatocītu bojāejas cēloņiem ir iekaisuma šūnu (neitrofilo leukocītu un makrofāgu) aktivitāte (Jubb et al., 1993). Izvērtējot statistiski sakarību starp iekaisuma šūnām un hepatocītu apoptozi, atklājās, ka pie ļoti lielās vai vidējas apoptozes iekaisuma šūnu ekspresija būtiski neatšķiras, turpretim pie mazas apoptozes - to daudzums būtiski ir mazāks. Aprēķinātā statistiskā sakarība uzrāda, ka iekaisuma šūnām ietekme uz apoptozi nav būtiska. No minētā secinām, ka apoptozes process var notikt

arī bez iekaisuma reakcijas attīstības, kas sakrīt ar pētnieku (Green, 1998; Green, Ree, 1998; Rubin, Farber, 1999) datiem, kā arī iegūtais relatīvi nelielais vidējais apoptotisko šūnu skaits aknās atbilst citu zinātnieku datiem par to, ka imūnregulācijas un infekciju laikā aknās var novērot apoptozi (Rubin, Farber, 1999). Tā kā iegūtie rezultāti neparādīja hepatocītu apoptozes korelāciju ar iekaisuma šūnu infiltrāciju, mēs uzskatām, ka ir kāds cits cēlonis, kas rada apoptozi. Pētnieki (Klatskin, Conn, 1993; Schulte-Hermann et al., 1997; Rubin, Farber, 1999) apgalvo, ka šāds process ir raksturīgs virālām infekcijām, jo kaspāzes aktivitātes pieauguma un šūnas mitohondriju bojājumu kombinātās iedarbības rezultātā aktivējas ferments endonukleāze un sākas internukleosomāla DNS fragmentācija. Taču mūsu pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem šo nelielo apoptotisko hepatocītu daudzumu, iespējams, varētu izskaidrot ar organismā persistējošā ūdeļu Aleuta slimības vīrusa klātbūtni, jo vīrusu iedarbības rezultātā var tikt kavēts apoptozes process, tiem inhibējot nukleāro proteīnu p53 un kaspāzes, kas izraisa šūnas DNS bojājumus (Rubin, Farber, 1999).

Kopumā pētījums parādīja, ka ir daudzveidīgs barības mikoloģiskais piesārņojums un Aleuta slimības vīrusa skartām ūdelēm pelējumsēņu izplatība arī parenhimatozajos orgānos, īpaši aknās. Vienlaicīgi aknās konstatētai iekaisuma šūnu infiltrācijai, deģenerācijas marķieru kā matricē metaloproteināžu ekspresijai, bazālās membrānas bojājumiem, hepatocītu apoptozei, aknām tomēr ir saglabāta būtiska reģenerācijas spēja, par ko liecina augšanas faktoru intensīva izdale: no zvaigžņveida šūnām (nervu augšanas faktora receptori - NGFR p75), no aknu parenhīmas un neparenhīmas šūnām (hepatocītu augšanas faktors – HGF) un no periportālajiem hepatocītiem (vaskulārais endoteliālais augšanas faktors – VEGF).

Būtiski būtu novērst ūdeļu barības piesārņojumu un ieviest jaunākās imūnhistoķīmiskās diagnostikas metodes patoloģisko procesu izmeklēšanā, lai uzlabotu kažokzvēru izdzīvošanas un izkopšanas iespējas.

## SECINĀJUMI

1. Ūdeļu barību raksturo daudzveidīgs mikoloģiskais piesārņojums, galvenokārt, ar *Aspergillus*, *Candida* un *Penicillium* ģintīm.
2. Konstatējot barības kontamināciju ar pelējuma sēnēm, no Aleuta slimības skartu ūdeļu aknām izolē visvairāk (11), bet no nierēm un plaušām - ievērojami mazāk (6) pelējumsēņu pārstāvjus, galvenokārt, *Aspergillus* un *Candida* ģintis.
3. Par mikroskopisko sēņu klātbūtni ūdeļu aknās liecina hīfas starp hepatocītiem visās aknu acinusa zonās; raugveida formas starp hepatocītiem periportālajā, perivenulārā zonā un interlobulārajos žultsvados, kā arī iekaisuma šūnu infiltrācija ap portālo traktu un visās parenhīmas daļās.
4. Vājā fibroblastu augšanas faktora receptora (FGFR) ekspresija aknu periportālajā daļā, galvenokārt, limfocītos un makrofāgos, iespējams saistīta ar iekaisuma hronisko norisi.
5. Vaskulārā endoteliālā augšanas faktora (VEGF) aktivitātes pieaugums periportālajos hepatocītos dzīvniekiem ar aknās sākušos apoptozi norāda uz iespējamu šī augšanas faktora anti-apoptotisko lomu.
6. Nervu augšanas faktora receptors (NGFR) tiek ekspresēts no hepatocītiem aknu bojājumu laikā un tā izdale saistās ar iekaisumu un / vai distrofiju, par ko liecina NGFR ekspresija vairāk ap žultsvadiem un periportālā daļā vienlaicīgi ar iekaisuma šūnu infiltrāciju.
7. Hepatocītu augšanas faktora (HGF) izkliede galvenokārt ap žultsvadiem un portālajiem traktiem sakrīt ar iekaisuma un raugveida formu klātbūtnes zonām, norādot, ka faktors stimulē ne tikai aknu parenhimatozo šūnu, bet arī biliāro epiteliālo šūnu proliferāciju.
8. Ūdeļu aknu asinsvados laminīns, IV tipa kolagēns un fibronektīns atrodams fragmentāri, un, galvenokārt, tikai mazajos asinsvados, kas norāda uz iespējamu lokālu asinsvadu bojājumu orgānā.

## IETEIKUMI

1. Ūdeļu barības komponentu uzglabāšanas un sagatavošanas laikā novērst apstākļus, kas sekmē mikroskopisko sēņu attīstību.
2. Lai izvairītos no lieliem ekonomiska rakstura zaudējumiem, ko izraisa dzīvnieku krišana un pazemināta auglība, zvērsaimniecībās ir jāorganizē regulāra ūdeļu barības komponentu mikoloģiskā izmeklēšana un barības piesārņošanas gadījumā jāveic attiecīgi pretpasākumi.
3. Dzīvnieku nāves cēloņu un aknu patoloģiju noskaidrošanai izmantot diagnostisko imūnhistoķīmiju, nosakot sekojošus marķierus: FGFR, VEGF, NGFR, HGF, aknu struktūru bazālās membrānas, MMP un apoptozi.

## ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

1. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2005) Ūdeļu barības līdzekļu patogēno sēņu ietekme uz ūdeļu morfopatoloģiju. No: *Latvijas Ārstu kongress*. Tēzes. Rīga, 46. – 47. lpp.
2. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Ūdeļu barības mikroskopiskās sēnes un to ietekme uz ūdeļu morfopatoloģiju. *LLU Raksti*, No. 16 (311), 40. – 49. lpp.
3. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Mycological contamination of mink feed and it's influence on the morphopathology of internal organs. In: Anatomische Gesellschaft – 101st Annual Meeting, *Abstracts*, Freiburg, p. 191 - 192.
4. Valdovska A., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2006) Fungi in mink feed and morphopathology of the liver. In: 2nd Annual General Meeting, *Abstract book*. Malta, p. 45 – 46.
5. Valdovska A., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2006) Fungi in the mink feed and organs. In: *Proceedings of 12 International scientific conference „Research for rural development 2006”*, Jelgava, p. 253 – 257.
6. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Nerve Growth Factor receptor (NGFR) in the mink liver. In: 10th National Congress of Anatomy. Bodrum, Turkey, *Neuroanatomy*, vol. 5, p.34.
7. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Matrices metaloproteināzes MMP-2 un MMP-9 ūdeļu aknās. No: *Starptautiskās zinātniskās konferences „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna.” Raksti*, Jelgava, 299. – 302. lpp.
8. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2007) Mikroskopisko sēņu izraisīta iekaisuma ietekme uz ūdeļu aknu bazālo membrānu. No: *RSU Zinātniskās konferences tēzes*, Rīga, 137. lpp.
9. Valdovska A., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2008) Growth factors in mink liver in cases of mycoses. *Agraarteadus*. (iesniegts publicēšanai)

**Latvia University of Agriculture**  
Faculty of Veterinary Medicine

Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra”

Mg. med. vet. **Anda Valdovska**

**Examination of mink parenchymal organs affected by moulds on a  
background of Aleutian disease**

**SUMMARY**  
of doctoral thesis  
for scientific degree Dr.med.vet.

**Sigulda – Rīga - Jelgava**  
**2008**

# INTRODUCTION

## Topicality of the work

Fur-farming in Latvia is one of the sectors of agriculture with several decades' long experience. Currently there are 14 fur farms engaged in a commercial rearing of fur animals. A dynamics of mink breeding herd development in Latvia in the last few years shows a stable and gradual growth. A number of cubs reared in 2005 as compared with 2004 increased by 9.03 %, but in 2004 – as compared with 2003 – by 8.36 %.

Although economic indexes show that fur-farming currently is a successful sector in Latvia however a significant index of fur-farming efficiency is a number of cubs obtained. In 2003, in average 3.68 cubs were obtained per female, in 2004 – 3.56 cubs, but in 2005 – 3.88 cubs. These data proves, that a number of cubs obtained from one female during these 3 evaluated years is rather low as compared with other countries, which possibly is a proof of certain health problems in the herd of fur animals.

The sector suffers considerable losses due to a widely-spread Aleutian disease of mink. Unfortunately, no adequate attention to eradication of this disease is paid to in all mink herds.

One of the reasons for instability of these indexes could be a contamination and poor quality of animal feed materials that has a direct impact on health of the heard, including reproductive ability. Wenzell and Keil (1980) also point out that in Germany a reason for 60 % cases of fur animal diseases is contamination of feed or inadequate feeding. Thus peculiarities of keeping and feeding of fur animals – a high stocking density of animals on a small territory, preparation of feed mixtures on the spot at a farm kitchen, a high content of animal protein and fats in feed mixtures, use of unheated animal products in preparation of feed mixtures, physiological requirement of animals for balanced feed with a high nutritional value depending on a seasonality – can facilitate diseases of animals caused by relatively pathogenic microorganisms, including microscopic fungi (Перельдик и др., 1981) particularly if their immunity protection is reduced.

Some indications can be found in literature (Juokslahti, 1978; 1979) regarding bacteriological examinations of ready-mixed feed and feed materials for minks but there is not enough data on microbiological contamination of feed and its impact on organism of fur animals therefore we have carried out such a research. Until now there were no research carried out in Latvia on presence of microscopic fungi in mink feed and their impact on animal health.

**Hypothesis** of our paper is based on an assumption that in addition to bacteriological contamination the presence of microscopic fungi is also possible in feed materials, which causing a disease brings about disorders of mink reproductive system, hinders development of young animals, causes a high mortality rate and creates considerable economic losses. Therefore a significant problem is to study diseases of unclear etiology and lethality of minks and their cubs affected by Aleutian disease virus.

Taking into account the abovementioned, the **aim** of the paper was to clarify distribution of moulds in mink feed materials and after feeding to determine pathological processes in parenchymatous organs on the background of Aleutian disease virus.

### **Tasks of the work**

1. To investigate the presence of mould genus in mink feed materials.
2. To investigate the presence of moulds in parenchymatous organs of minks and to determine their genus.
3. To clarify factors inducing activity reduction of minks immune system.
4. By means of immunohistochemical methods to investigate morphopathology of mink liver affected by Aleutian disease virus in cases of mycosis.

### **Scientific novelty of the paper**

1. It is for the first time in Latvia that a link between moulds present in mink feed materials and mycological contamination of parenchymatous organs of animals affected by Aleutian disease virus has been investigated.
2. New data has been obtained on pathological processes in mink liver in cases of mycosis.
3. For the first time in Latvia in veterinary medicine the latest immunohistochemical methods have been used in diagnostics of pathological processes in the following combination: VEGF, NGFR, MMP2 and MMP9, FGFR, HGF and components of basal membrane – Fn, Lm, collagen IV, and new results have been obtained in hepatopathology.

### **Approbation of the results of investigation**

The research results have been approbated in the following international scientific conferences:

1. RSU Scientific Conference, Riga, March 29 – 30, 2007. *Influence of inflammation caused by microscopic fungi on basal membrane of mink liver.*
2. International scientific conference “Animals. Health. Food hygiene”. Latvia, Jelgava, November 10, 2006. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in mink liver.
3. 10th National Congress of Anatomy. Turkey, Bodrum, 6 – 10 September 2006. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Nerve Growth Factor receptor (NGFR) in the mink liver.*
4. 12 International scientific conference „Research for rural development 2006”. Latvia, Jelgava, 17 – 20 May, 2006. *Fungi in the mink feed and organs.*
5. 2nd Annual General Meeting. Malta, 3 – 6 May 2006. *Fungi in mink feed and morphopathology of the liver.*
6. Anatomische Gesellschaft – 101st Annual Meeting. Germany, Freiburg, 7 – 10 April, 2006. *Mycological contamination of mink feed and it's influence on the morphopathology of internal organs.*
7. Congress of Latvian doctors. Latvia, Riga, June 16-18, 2005. *Influence of mycological contamination of mink feed on morphopathology of minks.*

**Scope of the paper.** The doctoral thesis consists of 120 pages and it constitutes: annotation, introduction, survey of literature and methodology, research results, discussion, conclusions, recommendations, the list of literature and annex.

## MATERIAL AND METHODS

The research was carried out in the period from July 2004 to April 2007. We obtained samples of mink feed from four fur farms in Latvia. Feed for microbiological examination was randomly taken from warehouses and cold stores of fur farms – samples of frozen offal of pigs and bovines (lungs, larynx, trachea, fat and fore stomach of bovines), by-products of frozen fish, hemoglobin powder, bone meal, protein powder, bran, wheat/barley meal and wheat/barley grain as well as samples of ready-mixed feed. In general 11 samples of ready-mixed mink feed and 32 samples of feed materials have been examined.

To determine the influence of microscopic fungi on mink organism, we randomly selected 18 dark brown, seven months old minks, undergoing a period of growing and fur development (maturing), which did not show any visible clinical symptoms of the disease. After parenteral euthanasia of animals we sampled their internal organs with 1 ml of dithilin solution (Jepsen et al., 1981).

### A general scheme of the experiment

We made mycological methods on Sabouraud media for mink feed components chosen for mycological examination (n=32) and samples of ready-mixed feed (n=11) as well as samples of mink parenchymatous organs (n=54) (Willard et al., 1994).

Prior to obtaining of mink internal organs, we carried out an postmortem examination on animals applying Hunter and Lemieux (1996) method.

Samples (0,5 – 1 cm thick) of organs obtained from 18 minks (liver, kidney, lungs) were placed into formalin solution (120 g per 1 liter of water) for histological examinations, which we stored in room temperature.

Pieces of mink liver tissue, which have been stored in formalin, we placed into paraffin. Blocks of tissue confined in paraffin were cut with microtome into 6 -7  $\mu\text{m}$  thick pieces. The cuts from microtome we placed into water at the temperature 50 °C and after that they were placed on a clean defatted glass slide. These preparations were dried in thermostat at the temperature 56 °C for 20-60 minutes (Eurell, Frappier, 2006). In general, 612 histological cuts prepared from liver of 18 minks were used for 16 different coloring methods for histological and immunohistochemical examination.

### Mycological examinations

Series of samples and dilutions of mink feed components and ready-mixed feed we carried out according to standard ISO 7954:1987 “Determination of a number of yeasts and moulds in animal feed”. Preparation of dilution series covered the following stages. We weighted 10 g of a sample to be examined and placed it into a retort, containing a sterile salt-peptone (code CM0733, OXOID, England) solution (9.5 g of dry media is dissolved in 1 l of distilled water) (90 ml). After 15 minutes long extraction in Shutel device, we took 1 ml from the prepared initial sample and placed it into another salt-peptone solution (9 ml), thus obtaining dilution of the product 1:100 as well as 1:1000.

For mycological examination we placed on Petri plates 1 ml of feed extract from each dilution. After that we poured 15-20 ml of melted (and chilled until at least 45 °C) Sabouraud media and stirred carefully.

We made mycological inoculates of mink parenchymatous organs as follows – we burned on a flame a small surface of altered tissue and cut with sterile scissors from their width pieces of tissue with which we made streaky inoculates on media or placed

them on a surface of agar (4 -5 small pieces of tissue 0.5 cm x 0.5 cm in size) (LaRocco, 1992; Quinn et al., 1994).

All mycological inoculates on Petri plates were incubated in thermostat up to 4 weeks at the temperature 26 °C (Quinn et al., 1994; Кузнецов, 2001). We microscopied the grown colonies on a day 5 but slowly growing on - a day 9 and further as necessary.

Native preparations of moulds were prepared according to a generally accepted methodology – 1 drop of a solution for preparation of native preparations is put on a glass slide (spirit 96° - 20 ml; glycerin – 40 ml and distilled water – 40 ml), a small amount of mycelia substratum is placed into it and covered with a cover-slip (LaRocco, 1992).

We assessed macroscopic traits for each identifiable culture – top and bottom color of the colony, texture of the colony, growing speed (according to both the time and diameter of the colony). Microscopic traits were based mainly on characteristics of hypha septating and conidiogenic type of tissue (Саркисов и др, 1953; Emmons et al., 1970; Moore-Landecker, 1975; Frey et al., 1985; Kwon-Chung, Bennett, 1992; Bridson, 1993; Larone, 1995; Кириленко, 1997; Ulloa, Hanlin, 2000; Саттон и др., 2001).

### **Diagnostics of Aleutian disease of minks**

We took small size blood samples (up to 5 ml) from mink, cutting off a claw of their hind leg finger (amputation) (Jepsen et al., 1981).

In diagnostics of Aleutian disease of minks we used immunoelectroosmophoresis reaction (IEOFR). According recommendations of Slugin (Слугин, 1984) we poured 30 ml of 1 % hot agar solution on a clean defatted glass slide (8 x 15 cm). After agar gel coagulated 204 cavities were made in it with a diameter of 2,8 mm, depth – 2,5 mm and actual volume about 0,01 ml with a perforator connected to vacuum pump. The distance between centers of adjoining cavities horizontally were 6 mm. In immunoelectroosmophoresis reaction we used medinal-veronal buffer solution with pH from 8.6 to 8.9. Buffer solution was prepared from 300 ml of distilled water where 10.32 g of medinal was diluted and afterwards 1.84 g of veronal was added. Buffer solution was poured into water bath at the temperature +40 °C until a full dilution of veronal. After that distilled water was added to buffer solution until the volume of this solution reached 1 liter.

A capillary part containing mink blood serum was broken off and by means of a rubber pipe serum was fed into a respective cavity of agar gel. For a control reaction the last cavities 10 and 12 of vertical row were filled with a respectively positive and negative serum of mink blood. Antigen of Aleutian disease by means of Pasteur dropper was entered into cavities of uneven rows (also in the control row).

The glass slide thus prepared was placed into electrophoresis cabinet so that electric current flows parallel to horizontal rows of cavities. 4-5 streaks of filter paper was attached to margins of the glass slide and their loose ends were inserted into the bath sections filled with buffer solution. The electrophoresis chamber was covered with a lid and connected to a rectifier of electric current so that “+” pole would be on a right side of the glass slide. Current intensity was 10-15 mA, but voltage 220 V.

In case of a positive reaction a straight, thin and well expressed precipitation line could be observed in horizontal rows in gel approximately in the middle of cavities filled with mink blood serum and antigen.

### **Methods of histological research**

In general 612 histological cuts prepared from liver of 18 minks were used for coloring with a view to morphological examination by hematoxylin and eosin (H & E)

(Aughey, Frye, 2001), by Hotchkiss-McManus periodic acid – Schiff (PAS) (Quinn et al., 1994), Perls (Cook, 1994) and TUNEL reactions (Negoescu et al., 1998), biotin-streptavidin immunohistochemical method (Hsu et al., 1981; Эллиниди и др., 2002), as well as by immunohistochemical fluorescence method (Pilmane et al., 1998).

### **Staining of preparations with hematoxylin and eosin**

After de-paraffining of preparations they were colored with hematoxylin for 7 minutes. After that preparations were rinsed with water for 10 minutes. Then followed coloring with eosin for 2 minutes after which preparations were rinsed with water for a short time. Coloring was followed by dehydration in spirit solution of increasing concentration and in xylol. The colored preparations were coated with polystyrene and covered with a cover-slip.

In the result of coloring basophilic parts of a cell were colored in blue violet shades but acidophilic – from pink to dark red.

### **Hotchkiss-McManus periodic acid – Schiff (PAS) reaction**

After de-paraffining of preparations they were subject to oxidation for 20 minutes with  $K_2SO_4$  solution. After that they were thoroughly rinsed with distilled water and then followed 15 minutes long coloring with Schiff reagent. After rinsing with water we used hematoxylin for contact coloring (2 minutes, gain followed rinsing of preparations with water (5 minutes) then dehydration in spirit solutions of increasing concentration and in xylol as well as coating of the colored preparations with polystyrene and covering with a cover-slip.

In the result of coloring fungi elements were colored in slightly red color.

### **Perls reaction**

After de-paraffining of preparations they were colored for 30 minutes with a mixture of 2% HCL + 2%  $K_4[Fe(CN)_6]$  then followed rinsing with distilled water and dehydration in spirit solutions of increasing concentration and in xylol. The colored preparations were coated with polystyrene and covered with cover-slip.

In the result of coloring liver macrophage were colored in electric blue.

### **TUNEL reaction**

In this case an apoptosis kit was used: *In situ cell Death Detection*, POD Cat.no.1684817, Roche Diagnostics (Germany) according to the technique described by Negoescu et al. (1998). De-paraffined pieces of tissue were kept at a room temperature for 10 minutes in PBS (phosphate buffer) (pH 7,5) solution. After that blocking of endogenous peroxidase activity was carried out for 30 minutes with 3 % hydrogen peroxide then pieces of tissue were washed (3 x 5 min) in PBS solution. Cuts of tissue pieces were placed into citrate buffer solution and put into microwave oven for 10 minutes to fix antigen. After that they were chilled at a room temperature. Afterwards they were washed in PBS solution and placed for 10 minutes in 1 % BSA (oxen serum albumen) for PBS. Tissue cuts were incubated with TUNNEL for 60 minutes in a tank with temperature 37 °C and with a moistened air. After rinsing, PBS tissue cuts were incubated for 30 minutes at 37 °C POD (Fab fragment bound by sheep antfluorescence antibodies with horse radish peroxidase). After that cuts were covered for 7 minutes with DAB (diaminobenzidine) for determination of peroxidase. The tissue cuts were rinsed with distilled water, for contact coloring (20 seconds) hematoxylin and eosin were used. The colored preparations were coated with polystyrene and covered with cover-slip.

### **Biotin – streptavidine immunohistochemical method**

Upon applying biotin – streptavidine immunohistochemical method we determined the presence in mink liver tissue of vascular endothelial growth factor (VEGF, code M7273, 1:50, DakoCytomation, Denmark), nerve growth factor receptor (NGFR, code M3507,, 1:150, DakoCytomation, Denmark) matrix metalloproteinase (MMP2 (code AF902) and MMP9 (code AF909) (1:100, R&D System, Germany), fibroblast growth factor receptor (FGFR, code ab10646, 1:100, abcam, England), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ , code T1654, 1:1000, SigmaBioScience, USA), fibronectin (Fn, code A0245, 1:100, rabbit Ig, Dako, Denmark), laminin (Lm, code 2233PLA, 1:25, EuroDiagnostics, Denmark), IV collagen (code 2233 PCO, 1:25, EuroDiagnostics, Denmark) as well as hepatocyte growth factor (HGF, code AF294NA, 1:300, R&D System, Germany).

We carried out de-paraffination according to generally recognized scheme. After rinsing of preparations (10 minutes) in PBS (phosphate buffer, pH 7.4) solution, we immersed them in 4% buffer solution of hydrochloric acid sodium citrici and placed in a microwave oven for 20 minutes. After rinsing of chilled preparations with PBS we covered each cut with 150 $\mu$ l of 3 % hydrogen peroxide (10 minutes). Preparations again were rinsed with distilled water and PBS and then drops of primary antibodies were put on preparations (for example, VEGF, etc.) – 30  $\mu$ l per each cut (exposure time – 2 hours) as well as we covered preparations for 30 minutes with LSAB + LINK (secondary antibodies bound with biotin) (code K 1015, DakoCytomation, Denmark), for 25 minutes we covered preparations with LSAB + KIT (streptavidin that is bound with enzyme peroxidase) (code K0690, DakoCytomation, Denmark), and for 10 minutes – DAB (homogeneous system of substratum) (code K3468, Dako, Denmark). After that preparations were colored for a short time in hematoxylin.

In case of a positive reaction desirable structures were colored brown.

### **Fluorescence immunohistochemical method**

De-paraffination for this reaction we also carried out according to generally recognized scheme. Treatment of preparations with PBS (phosphate buffer) together with 0,25% TRITON X – 100 (2,5 ml per 1 l) for at least 1 hour, was followed by incubation in refrigerator in water compartment for at least 18-24 hours of tissue samples (with applied primary antibody Rabbit antihuman (for example, IV collagen, etc.). After spreading on (exposure for 2 hours) of secondary antibody Rabbit Ig (code F0205, Dako, Denmark), we covered preparations with PBS (phosphate buffer) + glycerin (1:1) and covered them with cover-slip. The prepared cuts we stored in a freezer.

Upon application of immunohistochemical fluorescence reaction we found in mink liver tissues the presence of fibronectin (Fn, code A0245, A0245, 1:200, Dako, Denmark), laminin (Lm, code 2233PLA, 1:25, Euro-Diagnostics, Denmark) and IV collagen (code, 2233 PCO, 1:25, Euro-Diagnostics, Denmark), using the method developed by Pilmane et al. (1998).

### **Statistical processing of data**

For cell counting a quantitative method was used when we counted inflammation cells in three randomly selected fields of vision around liver vein in 400 X magnification but apoptotic hepatocytes – 3 different fields of vision (Автандилов, 1990; Willard et al., 1994). For assessment of liver growth factor, degeneration tracers, BM components and apoptosis discharge we used a semi-quantitative counting method for a relative quantity of positive structures (Pilmane et al., 1998).

For the purpose of data processing statistical methods were applied for a calculation of average value and standard deviation as well as Student t-test for comparing of average values (Arhipova and Băliņa, 1999).

To prove the significance of differences for non-parametric methods, calculation of a representation error of mean arithmetical is used with Student criterion (95 %) as well as mono-factor dispersion.

To compare distribution of results obtained by means of immunohistochemical methods, a relative frequency calculation model was used (Goša, 2003).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Factors influencing mink immune system**

Microscopic fungi get into digestive tract of animals together with feed however thanks to non-specific and specific protective factors of an organism they usually are not able to cause the development of mycosis. A higher body temperature is amongst non-specific physiological factors. A majority of warm-blooded animals has it about 39°C that is unfavorable for the development of microscopic fungi in an organism (Кузнецов, 2001). However immunodeficiency of the organism causes favorable conditions for the development of mycosis in animal organism.

### **Aleutian disease**

A major problem for fur farms is mink Aleutian disease, caused by an agent (parvovirus), which is propagating in macrophages and by depressing suppressors of T lymphocytes, plasmatic cells (pasmocytosis) are developing (Trubka, 2001). Upon applying imuno-electroosmophoresis reaction (IEOFR) we found out that 82 % of minks are positive towards Aleutian disease, and all minks used in our research were carriers of parvovirus thus indicating that animals have disorders of immune system (СЛУГИН, 1984; Ryan, 1994; Brooks et al., 1995). Because of this situation it is impossible to form a control group of minks free from parvovirus due to ethical and other considerations important for national economy.

### **Assessment of mink feed**

An important factor facilitating the development of mycosis is feeding of animals with a balanced feed. At fur farms where we took feed samples for analysis animal feed was prepared from both animal products (bovine and pig offal, blood, protein concentrates, fish and fish by-products and eggs) and plant products (meal, yeast, cabbage).

Comparing mink feed ration with the ration recommended by other authors (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) for weaned young animals in the period of July-November, we can conclude that energetic value of feed – 334 kkal corresponds to that indicated in literature on a daily physiological requirement for a relevant mink development period (230-470 kkal).

Digestible protein limit in calculations of mink ration is expressed as its amount (g) per 100 kkal of energy. According to data shown in literature (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) in autumn minks require 8.0-9.0 of digestible protein per 100 kkal of energy. In mink ration examined by us this amount constitutes 9.0 g of digestible protein per 100 kkal of daily energy. So weaned mink cubs are fully provided with the necessary digestible protein adequately to their physiological development period.

When analyzing fat content in feed ration per 100 kkal of energy, we can conclude that the experimental minks received 4.8 g of fat per 100 kkal. Some authors (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) recommend for weaned young minks in Baltic and Scandinavian regions in the period of July-November to provide from 3.2 to 4.8 g of fat per 100 kkal. Thus the experimental minks received a maximum amount of fat recommended by authors. It is important that a high content of animal proteins and fat in feed mixture can facilitate occurrence of diseases caused by relatively pathogenic microorganisms (Перельдик и др., 1981).

Upon assessing the amount of carbohydrates, in feed ration they constituted only 60 % of a minimum physiologically necessary amount because mink cubs in the period from July to November require 5-7 g of carbohydrates per 100 kkal of energy. The calculation shows that as a result mink organism is inefficiently utilizing digestible protein and fat also present in the feed (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985). It is found out that a long-term deficit of carbohydrates develops acidosis in minks, animals lag behind in their development and quality of fur deteriorates (Берестов, 1985) as well as due to acidosis environmental pH in digestive tract of animals is reduced (Maneviĉs, 1983) that facilitates reduction of resistance.

We can conclude from the above mentioned that correction of animal feed ration is needed by increasing a content of carbohydrates. Some authors (Перельдик и др., 1981; Берестов, 1985) recommend cooked grain meal as the most rational source of carbohydrates in mink feed.

Taking account of the abovementioned and acknowledging the fact that minks included into research program have a strong immunodeficiency (Слугин, 1984; Ryan, 1994; Brooks et al., 1995), and based on proofs that “opportunistic” fungi (that is part of a normal microbial flora of an organism or environment) infects only the organism with altered immune protection mechanism (Ryan, 1994; Rubin, Farber, 1999), it was important to clarify a possible coherence between mycotic contamination in feed and parenchymatous organs of minks, paying a major attention to morphological changes in liver because a generalized process can develop in animals with immunodepression (Young, 1970; Quinn et al., 1994; Hubalek et al., 1998; Guarro et al., 1999).

### **Distribution of microscopic fungi in mink feed**

Microscopic fungi are eucaryotes and they are widely-spread in the environment therefore our task was to clarify in this chapter the distribution of moulds in mink feed and its components and a possible distribution of these fungi also in mink organs (lungs and kidneys) but particularly - in liver.

Results of mycological examination of samples of ready-mixed mink feed and its components (Figure 1) showed their contamination with microscopic fungi.

Distribution of all 23 mould genus and species found in feed and raw material is also shown in Table 1. The results show a considerable contamination of ready-mixed mink feed and raw materials with microscopic fungi. We found *Aspergillus* and *Penicillium* genus in all raw materials of mink feed and in ready-mixed feed.

The most of (18 of 23) various mould genera and species have been found in grain. 17 genera of moulds found in grain and grain products (meal, bran) are described in literature as microscopic fungi widely-spread in the environment, particularly in soil (Емельянов, 1990; Kwon-Chung, Bennet, 1992 Кузнецов, 2001; Саттон и др., 2001). Most of all in grain and grain products simultaneously with *Penicillium* and *Aspergillus* genera we found also representatives of *Alternaria*, *Cladosporium* and *Fusarium*.

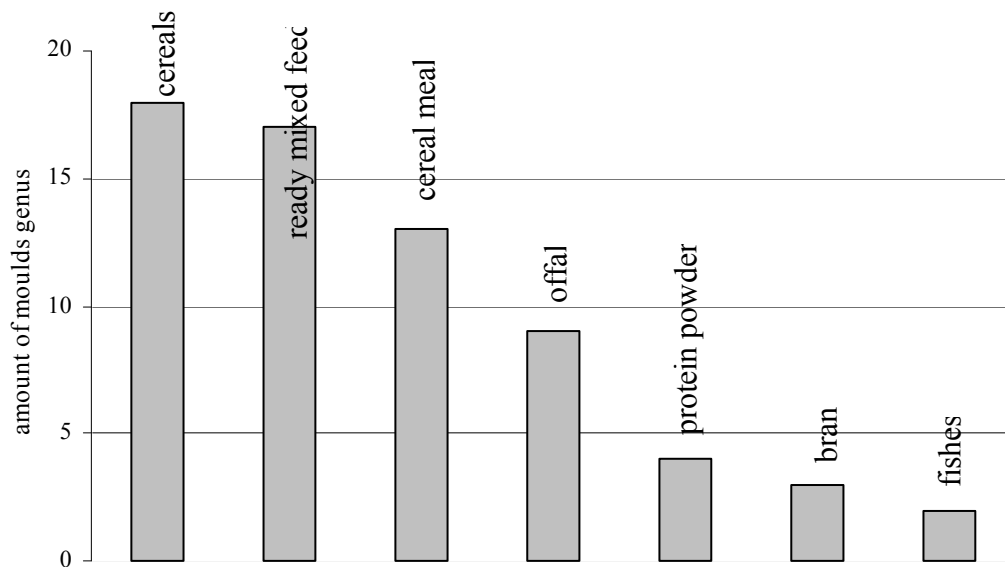


Fig. 1. Amount of moulds in mink feed

Table 1

Microscopic fungi in ready-mixed mink feed and raw materials

Microscopic fungi	Protein powder	Cereal meal	Cereals	Bran	Offal	Fish offal	Ready-mixed feed
<i>Acremonia atra</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Alternaria spp.</i>	-	+	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>Candida spp.</i>	-	+	+	+	+	-	+
<i>Chaetomium spp.</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>Cladosporium bantianum</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Coremiella cubispora</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Crysonilia sitophila</i>	-	+	+	-	-	-	-
<i>Curvularia spp.</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Fusarium spp.</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Gliocladium spp.</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Moniliella acetoabutans</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Mortierella spp.</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Mucor spp.</i>	+	+	+	-	-	-	+
<i>Penicillium spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sporothrix cyanescens</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Stemphylium spp.</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Trichophyton terrestre</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>Zygosporium masonii</i>	-	+	+	-	+	-	-
<i>Wangiella spp.</i>	-	-	-	-	+	-	+

Grain is considered as the highest risk product in relation to microbiological contamination also by other authors, particularly pointing out *Alternaria* and *Cladosporium* microscopic fungi as their spores are the most widely-spread in summer (Саркисов и др., 1953; Pritchard, Muir, 1987; Moss et al., 1989; Samson, 1989; Pereira et al., 2000; Поздеев, 2001). In general results of mycological examination obtained in Latvia on plant origin raw materials intended for preparation of mink feed confirms the facts described in literature regarding distribution of microscopic fungi in the said group of animal feed in many other countries (Moss et al., 1989; Knudtson, Kirkbrige, 1992 Кузнецов, 2001; Саттон и др., 2001). We found during the experiment an average contamination with microscopic fungi (9 genus) in pig offal intended for feeding of minks. A possible contamination of slaughter products with *Aspergillus*, *Sporothrix*, *Penicillium*, *Trichophyton* and *Candida* microscopic fungi is also confirmed by Кузнецов (2001). Although spores of microscopic fungi are able to develop within a vast range of ambient temperature – from 0 °C to 35 °C, other researchers like us have found *Cladosporium* in frozen meat products (Moss et al., 1989). There are no data in literature about distribution in animal origin feed materials of fungi *Wangiella*, *Zygosporium masonii* and *Stemphylium* genera, which we have found, still a possibility exists that these moulds are agents of systemic mycosis (Quinn, 1994). Within the scope of our research it was not possible to determine whether *Sporotrix cyanescens* microscopic fungi have got into pig offal from pigs affected by mycosis or based on data by authors (Спесивцева, 1964; Фейер и др., 1966; Кузнецов, 2001) who describe a vast distribution of *Sporotrix cyanescens* in the environment, pig offal have been contaminated after slaughter during processing, freezing, storing or transportation of offal. However other researchers are reporting about isolation of representatives of *Sporotrichum* genus from internal organs of animals (Спесивцева, 1964).

Latvian fur farms receive cut and frozen bovine and pig offal from suppliers therefore our research could not give answer whether a source of microscopic fungi are animals affected by mycosis or contamination occurred during cutting, freezing, storing or transportation in unsatisfactory hygiene circumstances. However, contamination of pig offal with microscopic fungi during treatment of feed or storage is scientifically possible. (Перельдик и др., 1981).

In coastal regions the second significant source of animal proteins for feeding of minks is fish. During the research we found only microscopic fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* genera in fish by-products included into ready-mixed of mink feed. There are no data in literature on distribution of the said microscopic fungi in fish by-products however researchers (Перельдик и др, 1981) point out that contamination with microscopic fungi is possible only in the result of unsatisfactory hygiene conditions of premises and equipment (products coming in contact with contaminated surfaces). Whereas in other research contamination of fish products with *Wangiella* microscopic fungi (Moeller, 2006) was mentioned, which was not confirmed during our research.

Dry hemoglobin is prepared by using heat treatment however we found in protein powder 4 genera of microscopic fungi, isolation of which is only partly confirmed by research carried out by other authors. *Aspergillus* and *Penicillium* (Перельдик и др, 1981) as well as *Trichophyton* (Кузнецов, 2001) genera have been isolated from fur animal feed during its storage in a warehouse. *Trichophyton terrestre* found during our research and, which is an agent of dermatomycosis in animals, shows that this microscopic fungi is not inactivated during heat treatment of animal origin proteins in the technological process of protein powder production. We consider that mycological contamination of protein powder has occurred mainly due to inadequate hygiene conditions during storage or transportation of the product. The presence of

*Mucor* is indirectly pointing to this fact as this mould is one of the most relevant contaminants of warehouses (Саттон и др., 2001).

During the research we found in ready-mixed of feed 16 genera or 74 % of all mould types isolated from feed or its raw material. Our examinations have been confirmed only by some authors, mentioning that animals, including minks, get infected with microscopic fungi alimentary, for example, with *Mortierella* (Carter, Wise, 2004) and *Trichophyton* (Nicmane, 1982; Кузнецов, 2001). A vast distribution of moulds can also be explained by the environment favorable for them because at fur farms lactic acid is added to ready-mixed feed with a view to restrict the development of microorganisms but ensuring at the same time an ideal environment for the development of moulds. An optimum pH for the development of moulds is 4.5 – 6.5 (Kwon-Chung, Bennett, 1992; Wilm, 2007).

Upon analyzing mycological contamination in individual feed components it must be concluded that of all microscopic fungi found in grain and grain products – 67%, as well as 75 % of those found in offal – we isolated mould genera also from ready- mixed feed. So, fungi have not been inactivated during heat treatment of meal mixes at the temperature 90 °C. A highest endurance showed *Trichophyton* mould, because both protein powder in the process of its production and pig offal during preparation of ready-mixed mink feed have been heat treated, nevertheless it has not affected viability of this microscopic fungi. A high endurance of *Trichophyton* spores is noted also by other researchers (Nicmane, 1982; Кузнецов, 2001). Some authors in their research have also obtained a confirmation of a high endurance of microscopic fungi in extreme conditions of temperature (Kwon-Chung, Bennet, 1992; Pasarell, McGinnis, 1992; Кузнецов, 2001) however several moulds (*Acremoniella atra*, *Alternaria* and *Coremiella cubispora*, *Crysonilia sitophila*, *Gliocladium* and *Zygosporium masonii*) found during our research in grain and grain products have been inactivated during heat treatment. In general, isolated microscopic fungi show a high endurance against a high ambient temperature. Our observation is confirmed by research carried out by other authors (Кузнецов, 2001; Поздеев, 2001) who explain that this endurance is ensured by peculiarities of microscopic fungi – multi-layer cell wall containing polysaccharides particularly chitin and ability to produce spores. Boiling destroys yeastlike forms of microscopic fungi in 10 - 15 minutes still we consider that in order to fully inactivate microscopic fungi in animal feed it must be heat treated at the temperature from 160 to 180 °C for at least 10 minutes because endurance of microscopic fungi against heat treatment increases in feedstuffs even more because mycelium is interweaving feed particularly grain, substratum (Кузнецов, 2011). Unfortunately such a heat treatment was not technically possible on fur farms covered by our research.

Upon analyzing mycological contamination we observed that of all microscopic fungi found in feed raw material 74 % were isolated also in ready-mixed mink feed. When assessing contamination of raw materials (meal and pig offal) subject to heat treatment, we found that of 18 representatives present in grain and grain products 13 representatives have (72 %) have got into ready-mixed feed but of 9 representatives present in offal, 8 (89 %) representatives were found in ready-mixed feed. Our research showed that raw material intended for mink feed and ready-mixed feed show a considerable mycological contamination with microscopic fungi (23 genera and species of microscopic fungi have been found, which points to the fact that they are able to adapt to different environments. Other researchers have also made such conclusions, asserting that adaptation of moulds depends on a feed substratum available to them (Braude et al., 1982; Кузнецов, 2001; Carter, Wise, 2004).

### Microscopic fungi in parenchymal organs of mink

Researchers (Емельянов, 1990; Carter, Chengappa, 1993; Quinn et al., 1994; Кузнецов, 2001; Carter, Wise, 2004) have proved that animals are infected mainly alimentary. Manevich (Maneviĉs, 1983) considers that the most sensitive animals against molded feed are horses, pigs, birds and also fur animals. In order to clarify the coherence between mycological contamination of feed and infection of an organism we determined the distribution of microscopic fungi in parenchymatous organs of mink.

Mycological examination showed a vast contamination of mink organs particularly liver with moulds (see Table 2).

Table 2

### Microscopic fungi in ready-mixed mink feed and in organs

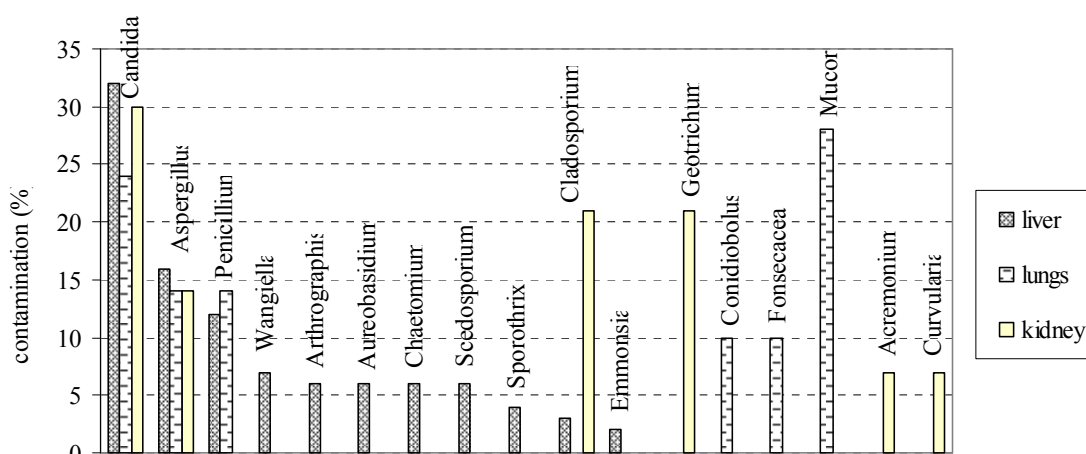
Microscopic fungi	Ready-mixed feed	Liver	Lungs	Kidney
<i>Acremonium spp.</i>	-	-	-	+
<i>Arthrographis kalrae</i>	-	+	-	-
<i>Aspergillus spp.</i>	+	+	+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	-	-
<i>Candida spp.</i>	+	+	+	+
<i>Chaetomium spp.</i>	+	+	-	-
<i>Cladosporium bantianum</i>	+	-	-	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	+	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	+	+	-	-
<i>Conidiobolus coronatus</i>	-	-	+	-
<i>Curvularia spp.</i>	+	-	-	+
<i>Emmonsia spp.</i>	-	+	-	-
<i>Fonsecaea spp.</i>	-	-	+	-
<i>Fusarium spp.</i>	+	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	+
<i>Moniliella acetoabutans</i>	+	-	-	-
<i>Mortierella spp.</i>	+	-	-	-
<i>Mucor spp.</i>	+	-	+	-
<i>Penicillium spp.</i>	+	+	+	-
<i>Scedosporium prolificans</i>	-	+	-	-
<i>Sporothrix cyanescens</i>	+	+	-	-
<i>Stemphylium spp.</i>	+	-	-	-
<i>Trichophyton terrestre</i>	+	-	-	-
<i>Wangiella spp.</i>	+	+	-	-

When carrying out the research we isolated 11 representatives of moulds from liver and 6 - each from lungs and kidney . The distribution of 17 fungi genera found in mink organs is shown in the Figure 2.

Upon analyzing results of mycological examination of mink organs - we divided microscopic fungi found in liver, kidney and lungs into two groups:

- 1) found in ready-mixed feed and organs – (*Aspergillus spp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida spp.*, *Chaetomium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Curvularia spp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium spp.*, *Sporothrix cyanescens*, *Wangiella spp.*) and
- 2) found in mink organs but not isolated form ready-mixed feed, microscopic fungi (*Acremonium spp.*, *Arthrographis kalrae*, *Conidiobolus coronatus*,

*Emmonsia spp.*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Geotrichum candidum*, *Scedosporium prolificans*).



**Fig. 2 Amount of microscopic fungi genus in mink organs**

#### Microscopic fungi found in ready-mixed feed and parenchymatous organs of mink

In the result of research of 10 mould genera we found in ready-mixed feed and also in all internal organs of mink (such as liver, lungs and kidney) only representatives of *Aspergillus* and *Candida*, which are mentioned in literature as the most frequent agents of disseminated infections (Саттон и др., 2001). This finding characterizes a high endurance of these genera and ability to adapt to the environment. It is proved that *Aspergillus spp.* grows well at the temperature above 55 °C (Tansey, Brock, 1978).

The result of our research - *Aspergillus spp.* in all examined internal organs of mink – the distribution feasibility is also confirmed by some researchers who have found out in their research the contamination with *Aspergillus* of animal liver, lungs and kidney after alimentary or aerogenic infection (Nicmane, 1982; Myrvik, Weiser, 1988; Carter, Chengappa, 1993; Quinn et al., 1994; Кузнецов, 2001; Carter, Wise, 2004). Still there is not a sufficient data in literature on the distribution of *Aspergillus* genus exactly in mink organs. Although lungs are more often a gate for development of aspergilosis still the development of this mycosis is also possible in alimentary way (Young, 1970) because infection of *Aspergillus* genus can start also in mucosa of gastrointestinal tract causing haemorrhage or perforation as well as changes can occur also in kidneys and liver and other organs (Young, 1970; Kwon-Chung, Bennett, 1992). To our mind a vast distribution of a mould of this genus in mink organs is ensured by its ability to produce ferment (Kwon-Chung, Bennett, 1992). Positive results of mycological examination of mink feed regarding *Aspergillus* genus and at the same time no pathological changes being observed in mink lungs, which could be caused by the aforementioned mould in case of aerogenic infection, in general points to the fact that infection has occurred in alimentary way and the source of infection is a contaminated feed.

Contamination with fungi of *Candida* genus of mink liver, lungs and kidney found in our research correlates with the data obtained by some researchers regarding affected organs in animal organism after infection with the said microscopic fungi (Спесивцева, 1964; Braude, 1982; Carter, Chengappa, 1993), however there are no data in literature on the distribution of *Candida spp.* in mink organs. According to other researchers the digestive duct and grains have also been the main sources for isolation of this mould from animals (Kwon-Chung, Bennett, 1992). Nevertheless that *Candida spp.* is a part of a normal intestine flora in animals, in cases of a deep candidosis first of

all oesophagus and then stomach are mentioned as the basic gates of infection (Eras et al., 1972). Enteritis found in postmortem examination of experimental minks coincides with the research carried out by other authors (Спесивцева, 1964; Braude et al., 1982) on an intensive propagation of *Candida* microscopic fungi in mucosa of digestive tract in immunodepressive animals and the following development of an inflammation. Isolation of *Candida spp.* simultaneously from mink liver, lungs and kidney allows a conclusion that in minks the agent has caused a generalized disease that is confirmed by the work of researchers on a generalized mycosis caused by *Candida* in carnivorous animals (Macswen et al., 1979; Quinn et al., 1994).

*Penicillium* genus was a slightly less distributed, namely, only in liver and lungs. Our results are confirmed by authors who have found the agent in animals as a saprophyte in mucosa and lungs (Кузнецов, 2001) as well as they have isolated it in liver of dogs sick with penicillmycosis (Zanata et al., 2006). Taking into account the results of mycological examination of mink feed where contamination with microscopic fungi of *Penicillium* has been found in all tested samples and data on infection of animals with the agent in alimentary way (Емельянов, 1990) we concluded that the source of *Penicillium* could be a contaminated mink feed.

A possible contamination mink lungs with microscopic fungi *Mucor*, which we found during our research is confirmed by data of some authors (Спесивцева, 1964; Емельянов, 1990; Кузнецов, 2001) on a possible alimentary or aerogenic infection gate. Our conclusion is confirmed by Spesivceva (1964), by indicating that *Mucor* representatives can stay in respiratory organs of animals as saprophytes without causing the development of mycosis or a disease can be in a latent form.

At the same time in ready-mixed feed and kidneys we found only 2 representatives – *Cladosporium bantianum* and *Curvularia*. Although scientists consider *Curvularia* as a widely-spread phytopathogene still they also confirm that it can cause a disseminated infection (Guarro et al., 1999; Саттон и др., 2001) investigating diseases caused by this agent in horses, bovines, dogs and cats (Carter, Chengappa, 1993). It is possible that absence of pathologies indicated by authors in minks is connected with singularities of these species or intensity of the immune system.

In liver we found the highest contamination with moulds within this group. Apart from previously described *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* genera – we isolated other 5 representatives (*Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium spp.*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Sporothrix cyanescens* and *Wangiella spp.*). Literature provides a limited data on pathogenity of *Aureobasidium pullulans* but there are observations on mycotic dermatitis (Pritchard, Muir, 1987). Microscopic fungi *Chaetomium* also is able to cause skin mycosis and allergic reactions (Фейер и др., 1968) but there is a possibility similar to our conclusion that it can also be a reason for systemic mycosis (Саттон и др., 2001).

Also *Sporothrix cyanescens* that is one of the representatives of microscopic fungi *Sporotrichum* is a saprophyte that is widely-spread in the environment but data of other authors prove that yeastlike forms of this genus can be isolated from animal organs (Спесивцева, 1964; Фейер и др., 1966; Кузнецов, 2001) because they get into an organism via wounded skin and mucosa (Спесивцева, 1964).

The research proves that *Wangiella spp.* can also be an agent of systemic mycosis that correlates with the assessment made by other researchers however the most often literature refers to subcutaneous mycosis caused by this mould to cats, dogs, horses, bovines, goats and other animals (Quinn et al., 1994.).

There is no data available in literature that would confirm findings of our research, namely, isolation of microscopic fungi genus from internal organs of mink, however researchers have isolated *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Sporothrix*, *Mucor* and *Geotrichum* from bovine and pig internal organs (Kwon-Chung, Bennet, 1992; 2001).

Microscopic fungi found in parenchymal organs but not isolated from ready-mixed feed. We isolated from kidneys only 2 representatives – *Acremonium* and *Geotrichum candidum*. It is possible that *Acremonium* mould persists in urogenital duct of minks without causing a disease. Other researchers also provide such a confirmation because it is able to cause a disease in humans in spite of the fact that it is mentioned as a widely-spread contaminant (Саттон и др., 2001).

The other representative isolated from kidney - *Geotrichum candidum* – is causing a rare disease (geotrichosis) (Carter, Chengappa, 1993) albeit its saprophyte is widely-spread in soil (Myrvik, Weiser, 1988). During our research the finding of these microscopic fungi only in kidneys is confirmed also by other authors, asserting that although the infection is systemic usually only one organ is affected (Carter, Chengappa, 1993).

In lungs we found 2 representatives – *Conidiobolus coronatus* and *Fonsecaea pedrosoi*, which we did not isolate from ready-mixed feed of minks that proves their possible getting into an organism in aerogenic way. Our results are confirmed by Carter and Wise (2004) as communication of a disease can be aerogenic with dust, which is polluted by spores of microscopic fungi. The aforementioned fungi are characterized by researchers as widely-spread in soil (Саттон и др., 2001).

Our results on lung tissues affected by *Conidiobolus coronatus* are also confirmed by other authors (Kwon-Chung, Bennet, 1992) who declare that they have isolated this microscopic fungi from respiratory system of dogs and horses where the agent has caused infection in nasal mucosa.

Moulds found in liver such as *Arthrographis kalrae*, *Emmonsia*, *Scedosporium prolificans* – are widely-spread in the environment (Degavre et al. 1997; Hubalek et al., 1998; Ponton et al., 2000; Кузнецов, 2001).

During our research we isolated *Arthrographis kalrae* from mink liver, it is possible that pathogenicity is also based on an ability to grow at a higher temperature. Researchers have also proved that the agent is able to grow at the temperature 37 °C and 45 °C (Саттон и др., 2001).

We found in mink liver also *Emmonsia spp.* Similar observations are reported by Hubalek with co-authors (1998) indicating that the distribution of the said fungi is promoted by small rodents being carriers of these microscopic fungi. It is possible that *Emmonsia* gets into mink organism from rodent contaminated bedding. Still a possibility of the isolated representative to persist in mink organism is confirmed by Hubalek with co-authors (1998) as dimorphism of this fungi has been observed.

Similar to the abovementioned also a possibility of *Scedosporium prolificans* to persist in mink liver is confirmed by its ability to grow at 45 °C (Саттон и др., 2001).

Microscopic fungi found in ready-mixed mink feed but not isolated from parenchymal organs.

Analyzing mycological examination results shown in Table 2, we found out that there are moulds, which we isolated from ready-mixed mink feed but not from parenchymal organs. Such group constitutes 6 representatives – *Cladosporium herbarium*, *Fusarium spp.*, *Moniliella spp.*, *Mortierella spp.*, *Stemphylium spp.* and

*Trichophyton terrestre*. These representatives are described in literature as being widely-spread in soil, on plants and in the air (Саттон и др., 2001). *Trichophyton* when taken in perorally usually gets into skin from blood circulation (Trubka, 2000) therefore a failure to isolate the agent from mink organs can be explained by a typical pathogenicity of the agent. To our mind the rest of representatives of this group was prevented from getting into animal organism due to underdeveloped neutrophenia, which proves that there is not an excessive consumption of neutrophils (Jemeljanovs I., et al., 2007). Researchers have found *Fusarium* as an emerging pathogen only in patients who have a reduced number of neutrophilic leucocytes (Perfect, Schell, 1996). Our assumption is also confirmed by a statistical analysis as the agent (presence of microscopic fungi) did not influence a considerable growth or reduction of these cells.

Amongst all types of microscopic fungi found in the result of research 30 % constitutes the group of *Dematiaceous* fungi (*Alternaria spp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Curvularia spp.*, *Fonsecaea spp.*, *Scedosporium spp.*, *Stemphylium spp.*, *Zygosporium spp.*, *Wangiella spp.*) (Hogan et al., 1996; Ulloa, Hanlin, 2000; Kwon-Chung, Bennett, 1992). A common trait of these microscopic fungi is a presence of melanin in cell wall. Researchers (Жданова, Василевская, 1990) have proved that the presence of melanin pigment considerably influences endurance of these cells against ambient humidity, impact of temperature and solar radiation as well as ensures the viability in the environment with insufficient amount of nutrients. Furthermore darkly pigmented microscopic fungi, containing melanin have a higher resistance against protective factors of immunity that is one of the reasons why in the result of our research 42 % of all fungi isolated from parenchymatous organs of mink constitutes exactly *Dematiaceous* microscopic fungi.

In general we can conclude that a major part of isolated moulds was distributed in the environment. As minks were carriers of Aleutian disease virus then it was a significant factor facilitating entry of opportunists into parenchymatous organs.

### **Morphofunctional changes of the liver**

Taking into account a wide-distribution of microscopic fungi in the environment, from diagnostic point of view and following indications by authors (Фейер и др., 1968; Жаров и др., 2003) for a more accurate conformation of the mycosis diagnose we applied H/E method to tissues of mink organs (liver, lungs and kidney). It is generally accepted that portal vein (*v. porta*) collects blood from alimentary canal, spleen, gall bladder and pancreas by means of *v.mesenterica superior*, *v.mesenterica inferior*, *v.lienalis*, *v.cystica*, *v.gastrica sinistra*, *v.gastrica dextra* un *v.pregastrica* (Jubb et al, 1993) , hence there is a possibility for perorally ingested microscopic fungi to get further into the liver. Therefore in our further research we wished to clarify only morphofunctional condition of liver by applying several immunohistochemical methods.

#### **Microscopic fungi in liver**

Microscopic fungi from digestive tract, moving through specific and non-specific protective mechanisms can get into circulation of blood. Taking into account that we isolated relatively many genera of moulds from the liver and still postmortem examination picture was a variable one, results of our research correlate with opinion of several scientists that microscopic fungi can persist in internal organs of animals without developing typically clinical and postmortem processes (Myrvik, Weser, 1988; Carter, Wise, 2004).

Morphologically, in samples of 11 mink liver, which have been obtained from the liver with a dystrophic postmortem picture, we found out that in lumen of liver veins and

hepatocytes there are round inclusions, which resemble germs of dimorphic fungi. Although Lennette with co-authors (Lennette et al., 1974) indicates that these inclusions can be easily colored with hematoxylin however H/E method is not sufficiently selective and therefore we applied PAS method by means of which we found round yeast-like forms of fungi and hypha in fixed liver tissue. We found hypha in mink liver among hepatocytes in all areas of liver acinus however yeastlike forms of fungi were mainly in interlobular bile ducts and only few of them among hepatocytes in periportal area close to the triad and around the central vein.

Finding of microscopic fungi in a perivenular area can be explained by peculiarities of venous blood flow in liver as the portal vein, which is splitting anew into venous capillaries, which are further merging together forming liver veins (Daugerts et al., 1978) in such a way toxicants from stomach and intestine can get also into this area but finding of fungi in periportal area we can explain by the data (Scherr, Weaver, 1953) that in order to survive yeast-like forms require a necessary oxygen intake that is 5 - 6 times higher than for mycelia forms of a respective species.

The finding of microscopic fungi in bile duct coincides with the confirmation by some scientists (Jubb et al, 1993) that microscopic infections often invade bile ducts and at the same time agents cannot be found neither in blood nor tissues of organs.

Although applying microscopic examination methods we found very many mould genera however in mink liver tissues we saw few yeastlike forms of microscopic fungi and a little bit more of hypha however some authors (Фейер и др., 1968) indicate that any staining method of histological preparations does not ensure an even and specific coloring of all the microscopic fungi present in tissues.

Although effector cells (neutrophils and macrophages) destroy mycosis agents quite easily, still microscopic fungi, which have entered into an organism, are able to hinder intracellular destruction of phagocytes. The presence of yeast-like forms in the fixed liver tissues points to dissemination of the process and a possible diagnosing of mycosis. Our observation is confirmed by researchers that opportunistic mycosis causes a disease only in an organism with a mitigated immunity and besides in case of a strong immunodeficiency a mixed mycosis can be observed, which was caused by several species of microscopic fungi (Фейер и др., 1968; Rubin, Farber, 1999).

For a saprophytic colonization and a further dissemination in tissues of an organism fungi must cross mucosa of intestine (McGee et al., 1992). Postmortem examination of minks used in our research we observed inflammation of intestine mucosa in 67 % of cases (12 animals out of 18) that could considerably facilitate adhesion of agents to intestine mucosa. The other significant factor that could facilitate entering of fungi into blood stream – mechanical injury in mucosa of oral cavity, esophagus or intestine mucosa due to a presence of sharp bones in ready-mixed mink feeds. Similar conclusion is made by other researchers that mycotic invasion of walls of gastrointestinal duct is a widely-spread consequence for many diseases, and the injury affecting mucosa can be a serious reason for a systemic infection (Jubb et al., 1993; Ponton et al., 2000; Кузнецов, 2001; Xi et al., 2004). To our mind, injuries in mucosa of oral cavity, esophagus or intestine is one of the most essential problems on fur farms as they can be easily caused by sharp bones in ready-mixed mink feeds. The more so, a physiological peculiarity of oral cavity of minks should also be taken into consideration, namely, poorly developed molars in the result of which animals swallow feed practically without chewing (Берестов, 1985).

#### **Infiltration of inflammation cells**

Microscopic fungi after getting into an organism come into contact with phagocytes and inflammation factors (Кузнецов, 2001). Inflammation is a complicated

reaction, which gradually involves different types of cells. A strongly marked tissue infiltration with macrophages, neutrophilic leucocytes and lymphocytes was found in mink histological samples around the central vein of liver, which shows that there is a pathological process going on in mink liver.

Upon comparing distribution of inflammation cells, lymphocytes showed the largest distribution. There is an essential difference among cell count. In all histological samples of mink liver examined by us, macrophages constituted 328 cells (18.4 %), neutrophil leukocytes - 479 (26.9 %), but lymphocytes - 977 (54.7 %) of the total cell count (ie, 54.7 %). In healthy tissues there is hardly any neutrophil leukocytes they are in blood stream therefore our assumption about phagocytosis process of inflammation products is confirmed also by Keller (1991) and McGee et al., (1992). The presence of neutrophil leukocytes in tissues is a proof of an acute inflammation process (McGee et al., 1992). Jubb with colleagues also emphasizes that activity of neutrophils is significant for the development of mycosis (Jubb et al., 1993). Although in our research a number of neutrophil leukocytes was less by 27.8 % as lymphocytes still are a significant index of functional condition of mink liver. Klatskin and Conn (1993) confirm that a neutrophil infiltration of hepatocytes is observed in case of hepatitis and this is a proof of a parenchymal infection, and its placement around the triad is abnormal phenomena.

In liver samples we basically observed that the lobule architecture has been maintained but inflammation infiltrate, being rich in lymphocytes, is extending from a portal duct towards an adjoining parenchyma that is a proof of the pathological processes. As usually only few lymphocytes can be found around the triad (Klatskin, Conn, 1993) then authors (Macswen et al., 1979) characterize such a picture as a chronic and active hepatitis not inclined to liver necrosis however in some samples inflammation infiltration was still visible in all sections of parenchyma without covering only portal or periportal section. Authors (Macswen et al., 1979) characterize such a picture as a chronic and active hepatitis inclined to liver necrosis. In histological liver samples of our experimental minks we seldom found infiltrates of lymphocytes also around the central vein. Infiltration of lymphocytes is a proof of an inflammation source and characterizes a reaction triggered by infection of mycological nature (Willard et al., 1994).

Although Kupffer cells are most often found in the first section of acinus (Young, Heath, 2000; Ross et al., 2003; Young et al., 2006) still we found this cell infiltration in liver samples not only around portal ducts but also around the central vein. This coincides with the section where we found yeastlike forms of microscopic fungi. Infiltration of Kupffer cells develops on a later inflammation stages and characterizes intensity of immunity. Furthermore, in case of a chronic inflammation macrophages become active in the inflamed tissues (Keller, 1991) and via T cells activated macrophages get involved in mycosis reduction (Jubb et al., 1993). Other authors as well (McGee et al., 1992) indicate that a placement of Kupffer cells similar to that found by us in general can be a characteristic liver reaction to infection caused by microscopic fungi in an organism.

#### **Fibroblast growth factor receptor (FGFR)**

Upon assessing a classification of inflammation cells described in the chapter above, still open remains a question on a course of inflammation process where one of a characteristic features is FGFR activity. In the result of a chronic inflammation some changes take place in FGF (fibroblast growth factor) production or release, so there are changes also in a quantity of FGFR expression and/or activity (Thomson, Lotze, 2003).

Upon carrying out FGFR examination in liver of experimental minks, we found them in lymphocytes or macrophages thus our finding coincides with the data on the fact that a high and low activity FGF receptors are placed in cells and a complex FGF/FGFR is placed in the nucleus of a cell (Thomson, Lotze, 2003). As FGFR is involved in ECM degradation control, FGFR expression level directly proportionally influences cell proliferation and migration therefore our research results are indicative of a proliferative process of inflammation cells, the more so, of a chronic course of the process. Although FGFR expression is observed basically in periportal part, still it characterizes a chronic and acute nature of the inflammation and this confirms an inflammation caused by mycosis because if the infection have been caused by facultative intracellular microorganisms, it could happen that the organism is not able to fully eliminate an antigen, pathogen microorganisms persist in macrophages and cause a chronic inflammation (Keller, 1991).

#### **Vascular endothelial growth factor (VEGF)**

Vascular endothelial growth factor (VEGF), which is also known as vascular permeability factor – is one of the strongest endothelial penetrability factors (Essser et al., 1998; Rajkumar, 2001; Nolan et al., 2004).

During the research we found the increment of VEGF activity basically in portal hepatocytes. Consequently, the factor has incremented its activity in liver sections, which are richly provided with oxygen. We concluded that VEGF facilitates proliferation of sinusoidal endothelial cells and hepatocytes. This finding coincides with other research (Taniguchi et al., 2001; Shimizu et al., 2005) although there are also contrary data (Shimizu et al., 2005; Hironobu et al., 2006; Osada et al., 2006; Tsuchihashi et al., 2006), that hypoxia is stimulating VEGF expression. Findings of VEGF in the periportal area could be also explained by the fact that we found also Kupffer cells in this area, which are able to significantly trigger synthesis of the said protein (Taniguchi et al., 2001).

VEGF has been found also in liver blood vessels. It is important that in the result of factor activity the decomposition of blood vessels occurs, permeability of blood vessels increases and the inflammation process develops (Essser et al., 1998; Taniguchi et al., 2001).

Regardless of the fact that VEGF is produced by several types of cells, including macrophages, thrombocytes, leukocytes, polymorphonuclear neutrophils (Thompson, Lotze, 2003; Coenjaerts et al., 2004), within our research no positive coherence has been confirmed between inflammation cells and VEGF expression intensity. This proves that there is in mink organism a factor with a VEGF blocking effect. It turns out that a virus of *Parvoviridae* genus (consequently Aleutian virus also) has a oncosuppressive effect and blocks VEGF activity (Blechacz, Russel, 2004).

We observed the coherence in mink liver – if there are only some apoptotic hepatocytes then VEGF distribution is a considerable one. This shows that in the result of VEGF increment a response of the said organ to the damage is facilitated and it is connected with maintenance of sinusoidal homeostasis during liver dystrophy. In general, the increment of VEGF activity in periportal hepatocytes in animals with the commenced apoptosis points to a possible antiapoptotic role of this growth factor that concurs with other authors (Ueda et al., 2006).

#### **Nerve growth factor receptor p75 (NGFR)**

Kupffer cells have relevant significance in protection of an organism (Laskin, 1990), but these cells being activated and components, which are released by infiltrative neutrophils, also damaged cells, for example, peroxides of apoptotic cells, metabolites as well as free radicals ( $H_2O_2$  or NO) and metabolites of microscopic fungi, which result

in activation of liver macrophages, in general they are of a core importance for activation of liver HSC that can cause liver fibrosis and apoptosis of hepatocytes (Laskin, 1990; Mather, 1999; Tsukamoto, 1999; Wu et al., 1999; Oakley et al., 2003; Friedman, 2005). During fibrous damages hepatocytes are expressing NGF (or neurotrophine) (Oakley et al., 2003), but effectiveness of NGF activity is also increased by NGFR p75 from activated liver HSC (Rubin, Farber, 1999; Wu, Zern, 2000; Trim et al., 2000; Passino et al., 2007).

The research results demonstrated an average hepatic stellate cell count that correlated with apoptosis of activated hepatocytes. Observations testifies a response of liver to the damage. Researchers have also found that a major trait of a regeneration process is apoptosis of activated HSC (Issa et al., 2001). We concluded (similar to Oakley et al., 2003) that the nerve growth factor receptor (NGFR p75) is discharging from hepatocytes during liver damage and it is connected with apoptosis of HSC, however NGFR expression is not vital during liver apoptosis, which possibly is HSC adaptive and compensatory response not only to apoptosis itself but also to inflammation and/or dystrophy that is testified by NGFR expression more around bile ducts and in periportal area.

#### **Hepatocyte growth factor (HGF)**

Researchers have found that HGF is not present in healthy hepatocytes (Defrances et al., 1992; Miyazava et al., 1996; Ishikawa et al., 2001) as it is in an inactive form however in case of liver irritation or damage it transforms into an active form (Ljubimova et al., 1997; Hiroshi, Toshikazu, 2003; Watanabe et al., 2003). We observe HGF expression in all the mink liver samples. Discharging of HGF was basically observed in hepatocytes evenly or focally around bile ducts and portal ducts. We found a weak presence of the aforementioned factor also in endotheliocytes of blood vessels (interlobular vein), i.e., non-parenchymal cells. The HGF expression observed in our research basically in hepatocytes is also confirmed by results obtained by other authors (Rajkumar, 2001; Thompson, Lotze, 2003). Besides a dispersion of the growth factor more around bile ducts and portal ducts coincides with areas where inflammation cells and the presence of yeastlike form of fungi were found more often. This observation testifies that HGF acts as the factor, which improves liver regeneration during damage of the organ that is confirmed by other research (Sakaguchi et al., 1994; Ljubimova et al., 1997; Ishikawa et al., 2001; Watanabe et al., 2003; Hironobu et al., 2006). This can be explained by the HGF ability to stimulate the proliferation of not only parenchymatous liver cells but also of biliary epithelial cells (Joplin et al., 1992).

An increased apoptosis of cells indicate to the damage of an organ. We observed in mink liver samples the coherence between apoptosis of hepatocytes and HGF, namely, in liver with an average count of apoptotic hepatocytes the expression of the aforementioned growth factor was essential whereas in liver with a high apoptosis – HGF expression was low. This coherence that we observed could be explained by a molecule Bag-1, t.i. a possible domain for HGF signalization as binding of HGF with c-Met receptor causes activation of tyrosine kinesis and phosphorylation of this tyrosine is supplemented by intracellular signal molecules. It is proven that Bag-1 is directly responsible for anti-apoptotic activity of hepatocyte growth factor (Funakoshi, Nakamura, 2003).

#### **Basement membranes of liver structures**

A major function of matrix metalloproteinases is degradation of components of extracellular matrixes (ECM) (Sasaki, Tahara, 1995; Arthur, 1997, Friedman, 1999; Alexandrova, Nikolova, 2002; Hanumegowda et al., 2003) however a collagen of type

IV and laminine are also present in the basement membrane (McGee et al., 1992; Eurell, Frappier, 2006), including blood vessels.

In the research we found fragments of laminine, a type IV collagene and fibronectine in mink liver (individual fragments in walls of blood vessels), faintly expressed and basically only in capillary blood vessels. In bile ducts and large blood vessels we did not find them. This indicates to an increasing permeability of the basal membrane and a reduced preventive barrier of blood vessels. Thus it ensures reduced immune protective conditions (Клишо и др., 2005; Brown et al., 2006).

Components of the basement membrane in liver of experimental minks were practically absent in the case of marked expression of matrix metalloproteinases that testifies about a significant inflammation process. This is confirmed by the research that inflammation cells particularly macrophages are able to an active synthesis, increment and discharging of MMP-2 and MMP-9 of a type IV collagenesis (Birkedal-Hansen, 1993; Hanumegowda et al., 2003), which lyse the components of the basement membrane, a type IV collagen and laminin as well as proteoglycans, gelatins, elastyn and fibronectine (Twining, 1994). A possible influence of metalloproteinases on the components of the basement membrane is shown in the fact that positive structures MMP-9 in experimental mink liver often were placed close to blood vessels.

Virus of Aleutian disease is also a significant reason for the damage of blood vessel walls. Patogenesis of this virus is based on its ability to form complexes in blood (virus-antibody-complement), which attach themselves to walls of blood vessels, forming clusters and causing arteritis as well as a disappearance of the basement membrane (Porter et al., 1973; Trubka, 2001).

It must be concluded from the abovementioned that we have found in mink liver very significant factors facilitating development of mycosis.

#### **Matrix metalloproteinases (MMP)**

Matrix metalloproteinases (MMP) (MMP-2 and MMP-9) are endopeptidases, activity of which is regulated by inflammation and immunologic processes (Borregaard et al., 1995; Goetzel et al., 1996; Arthur, 2000; Sheu et al., 2001; Hanumegowda et al., 2003; Friedman, 2003; Visse, Nagase, 2003). Besides a higher activity of collagenesis has been notified in acute cases or on early stages of a chronic liver damages (Arthur, 2000; Opdenakker et al., 2001). The main function of matrixines (MMP) is degradation of extracellular matrix (ECM) (Arthur, 1997, Massova et al., 1998; Freidman, 1999; Alexandrova, Nikolova, 202; Hanumegowda et al., 2003). A complicated ECM is contained in Dishe space – a type IV collagen, laminin, proteoglycans and fibronectin (Ingber, 1991; Twining, 1994; Arthur, 1998; Hahn et al., 1980). As a result of ECM degradation the exchange of gases and substances between blood and hepacytes is considerably mitigated (Klatskin, Conn, 1993; Young et al., 2006).

In experimental minks we found structures discharging MMP-2 (gelatinase A) evenly distributed in liver lobules and a quite high infiltration of inflammation cells could be observed in parenchyma. Still we did not manage to observe correlation of MMP-2 with any groups of inflammation intensity. This could be explained by the fact that although neutrophilic leucocytes is a significant source of reacting oxygen species (ROS, t.i. extremely reactive O<sub>2</sub> metabolites – peroxide radical O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radical HO (Thannickal, Fanburg, 2000), which by means of a peroxide form is stimulating synthesis of HSC collagen, still an activated neutrohil produces also oxygen monoxide, which in contrary can reduce an initial discharging of peroxide in cells blocking MMP-2 secretion and reducing formation of fibrosis in liver (Asai, 2006). There is an opinion that MMP-2 intensity is increasing gradually by the development of liver fibrosis. Besides leucocytes during liver inflammation can develop

a strong combination with Kupffer cells, which alters activity of stellate cells (Asai, 2006) thus reducing MMP-2 expression. This means that a higher MMP activity is developing in case of acute damages by releasing the previously accumulated MMP from endothelial cells or from aflux and activation of inflammation cells (Benyon, Arthur, 2001). Arthur (1998) has also made a similar observation, stating that there is a little of gelatinase A in a healthy liver but it dramatically increases in case of liver diseases however he made a conclusion that as fibrosis is progressing, MMP-2 activity either do not exist or it is very small.

MMP-2 was discharged by macrophages and a little bit by fibroblasts although researchers have observed that MMP-2 is produced also by other inflammation cells, for example, sinusoidal endothelial cells, activated HSC and malignant cells (Birkedal – Hansen, 1992; Hanumegowda et al., 2003; Friedman, 2005).

Upon MMP-2 expression in mink liver, we observed a higher activity of gelatinase B in subgroup 2, t.i. with an average number of structures discharging MMP- and an averagely expressed inflammation. We found MMP-9 in Kupffer cells and a little bit also in inflammation cells in blood vessels. This could be explained the activity of Kupffer cells of which infiltration is developing on later inflammation stages and in case of a chronic inflammation they get activated in the inflamed cells (Kellers, 1992). Upon discharging of MMP-9, liver HSC additionally facilitates the activity of Kupffer cells (Opdenakker et al., 2001; Friedman, 2003) with a following ECM degradation and a further development of invasive process (Kanbe et al., 1999; Соловьева и др., 2001). Other authors also (Cursio et al., 2002) make a conclusion that gelatinase B is a common phenomena for inflammation cells and they are especially expressed by Kupffer cells, which play a major role in liver damage. At the same time when analyzing a structural breakdown of inflammation cells in mink liver it is clear that there were only 18.4 % of macrophages. So, there is some other factor that might facilitate discharging of MMP-9. For example, it could be also protease, elastase, which is one of the most effective pathophysiological activators of MMP-9 (Ferry et al., 1997).

Besides, positive structures of MMP-9 often were clustering close to blood vessels, which coincides with other researches, as activated collagenases are localizing near the basement membrane and affects it colagenolytically (Hanumegowda et al., 2003).

We statistically obtained a confirmation that oscillation of inflammation cell count are correlating with cells containing MMP-9 besides a difference is a considerable one. Consequently, a concentration level of gelatinases B (MMP-9) in tissues correlates directly with an inflammation process, which coincides with conclusions made by other researchers (Pirilä, 2003; Reif et al., 2005).

#### **Apoptosis of hepatocytes**

Apoptosis is genetically determined, internal cell destruction – self-annihilation mechanism, which is influenced by different conditions (Rubin, Farber, 1999). A reason for destruction of hepatocytes can be the activity of microorganisms (Klatskin, Conn, 1993). Hanzen and Glee (1995) explain that transformation of mycelia elements or conidia into mono-cell form and distribution in tissues of an organism leads to the destruction of vital tissues. Although authors (Фейер и др., 1968; Поздеев, 2001) emphasize that microscopic fungi are able to cause cell damages in an organism by altering metabolism and cell wall structure, still in the result of research we did not find a correlative link between a number of inclusions of microscopic fungi and apoptotic cell count as we found an average 12 - 14 apoptotic cell count, when the number of agent inclusions was an average one (++) , a little (+) or did not find then at all.

In the research we observed apoptosis of hepatocytes in liver samples of experimental minks in all parts of parenchyma although physiologically the apoptotic process is basically going on in vein area, which means that hepatocytes are developing in acinus 1 (periportal) section of liver and slowly migrates to area 3 (centrolobular) where they are degenerating (Klatskin, Conn, 1993; Green, 1998; Rubin, Farber, 1999). The dispersed apoptotic cells found during our research according to data by Klatskin and Conn (1993) testify about a systemic infection besides such infection, which is connected with infiltration of Kupffer cells and various number of neutrophil leukocytes.

One of the reasons for destruction of hepatocytes is the activity of inflammation cells (neutrophil leukocytes and macrophages) (Jubb et al., 1993). Upon assessing statistically a connection between inflammation cells and apoptosis of hepatocytes it turned out that under a very extensive or an average apoptosis, there is not a considerable difference in expression of inflammation cells whereas under a small apoptosis – their number is a considerably lower. The calculated statistical coherence shows that the influence of inflammation cells on apoptosis is not a vital one. From the above mentioned we can conclude that apoptotic process can also go on without the development of inflammation reaction that coincides with the data obtained by other researchers (Green, 1998; Green, Ree, 1998; Rubin, Farber, 1999) as well as a relatively small apoptotic cell count obtained in liver coincides with the data by other scientists that apoptosis can be observed in liver during immunity regulation and infection (Rubin, Farber, 1999). As the results obtained did not show correlation of apoptosis of hepatocytes with infiltration of inflammation cells, we consider that there is some other reason, which causes apoptosis. Researchers (Klatskin, Conn, 1993; Schulte-Hermann et al., 1997; Rubin, Farber, 1999) assert that such a process is characteristic for viral infections as in the result of a combined effect of caspases activity and damage of cell mitochondrion the ferment endonucleases activates and a internucleosomal fragmentation of DNS starts. Though regarding animals used in our research this small number of apoptotic hepatocytes can possibly be explained by the presence of Aleutian disease virus persisting in mink organism as the effect of this virus can hinder the apoptotic process by inhibiting them a nuclear protein p53 and caspases, which damage cell DNA (Rubin, Farber, 1999).

In general the research showed that there is a diverse mycological contamination of feed and in minks affected by Aleutian disease virus distribution of moulds also in parenchymal organs, particularly in liver, can be observed. At the same time, in spite of infiltration of inflammation cells found in liver, expression of degeneration markers as matrix metalloproteinases, damages of the basement membrane, apoptosis of hepatocytes, liver have still maintained a considerable regeneration ability that is testified by an intense discharging of growth factors: from hepatic stellate cells (nerve growth factor receptors – NGFR p75), from cells of liver parenchyma and non-parenchyma (hepatocyte growth factors – HGF) and from periportal hepatocytes (vascular endothelial growth factor – VEGF).

It would be vital to prevent contamination of mink feed and to introduce the latest immunohistological diagnostic methods in examination of pathological processes to improve a survival rate of fur animals and management possibilities.

## CONCLUSIONS

1. Mink feed is characteristic for a diverse mycological contamination mainly with *Aspergillus*, *Candida* and *Penicillium* genera.
2. Upon finding contamination of feed with moulds, from liver of minks affected by Aleutian disease is isolated most of all (11), but from kidneys and lungs – considerably less (6) representatives of moulds basically *Aspergillus* and *Candida* genera.
3. The presence of microscopic fungi in mink liver is shown by hypha among hepatocytes in all liver acinus sections; yeastlike forms among hepatocytes in periportal, perivenular area and in interlobular bile ducts as well as infiltration of inflammation cells around portal duct and in all sections of parenchyma.
4. A weak expression of fibroblast growth factor receptor (FGFR) in liver periportal area basically in lymphocytes and macrophages is possibly connected with a chronic run of the inflammation.
5. Increase in activity of a vascular endothelial growth factor (VEGF) in periportal hepatocytes in animals with liver where the apoptosis process has started, show a possible anti-apoptotic role of this growth factor.
6. Nerve growth factor receptor (NGFR) is expressed from hepatocytes during liver damage and its discharge is connected with an inflammation and/or dystrophy that is testified by NGFR expression more around bile ducts and in periportal area simultaneously with infiltration of inflammation cells.
7. Dispersion of hepatocyte growth factor (HGF) mainly around bile ducts and portal ducts coincides with areas of inflammation and presence of yeastlike forms, indicating that the factor stimulates proliferation of not only liver parenchymal cells but also of biliary epithelial cells.
8. In mink blood cells there are only fragments of laminin, a type IV collagen and fibronectin and mainly in small blood vessels that points to a possible local damage of blood vessels in an organ.

## RECOMMENDATIONS

1. To eliminate circumstances facilitating the development of microscopic fungi during storage and preparation of mink feed components.
2. In order to avoid economic losses caused by animal mortality and a reduced fertility, fur farms must organize a regular mycological examination of mink feed components and in case of feed contamination to carry out relevant corrective measures.
3. To clarify reasons for animal mortality and liver pathology to use diagnostic immunohistochemistry by determining the following markers: FGFR, VEGF, NGFR, HGF, basement membranes of liver structures, MMP and apoptosis.

## SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESIS

1. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2005) Influence of pathogenic fungi on mink feed material and mink morphopathology. From Congress of Latvian doctors. Thesis. Riga, p. 46 – 47.
2. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Microscopic fungi of mink feed and their influence on mink morphopathology. *LAU Articles*, Nr. 16 (311), p.40 – 49.
3. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Mycological contamination of mink feed and its influence on the morphopathology of internal organs. In: Anatomische Gesellschaft – 101st Annual Meeting, *Abstracts*, Freiburg, p. 191 - 192.
4. Valdovska A., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2006) Fungi in mink feed and morphopathology of the liver. In: 2nd Annual General Meeting, *Abstract book*. Malta, p. 45 – 46.
5. Valdovska A., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2006) Fungi in the mink feed and organs. In: *Proceedings of 12 International scientific conference „Research for rural development 2006”*, Jelgava, p. 253 – 257.
6. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Nerve Growth Factor receptor (NGFR) in the mink liver. In: 10th National Congress of Anatomy. Bodrum, Turkey, *Neuroanatomy*, vol. 5, p.34.
7. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2006) Matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in mink liver. From: International scientific conference „Animals. Health. Food hygien”. *Articles*, Jelgava p. 299 – 302.
8. Valdovska A., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2007) Influence of inflammation caused by microscopic fungi on the basement membrane of mink liver. From: Theses of RSU Scientific conference, Riga, p. 137.
9. Valdovska A., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2008) Growth factors in mink liver in cases of mycoses. *Agraarteadus*. (submit)