

НАРУШЕНИЕ КЕРАТИНИЗАЦИИ У ЗОЛОТИСТЫХ РЕТРИВЕРОВ: КЛИНИЧЕСКИЕ, ПАТОЛОГОГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ, УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Мари-Кристин Кадирг, Анита Пател, Дэвид Шерер, Рут Фермор, Сьюэл Миа и Анке Хендрикс

В последние годы ветеринары признали, что в породе золотистый ретривер существует заболевание кожи неприятного характера, которое характеризуется образованием у внешне здоровых собак обильной перхоти в виде больших по-разному пигментированных хлопьев. Хотя многие дерматологи и патологидерматологи обращают внимание на то, что число собак с подобными поражениями кожи увеличивается, в литературе этот факт представлен достаточно бедно. Различные заболевания человека, характеризующиеся подобной очевидной дисфункцией эпидермиса, объединены термином «ихтиоз». В ветеринарной литературе отражены всего несколько случаев ихтиозоподобных заболеваний у собак. Наиболее полно описан синдром наследственного эпидермолитического гиперкератоза у норфолкских терьеров, но все описанные случаи заболеваний у собак отличаются от того, что можно наблюдать в породе золотистый ретривер, где подобные дефекты, похоже, получили широкое распространение.

Задачами настоящего исследования являются:

- 1) дать клиническую характеристику нарушения ороговения;
- 2) описать структурные изменения, связанные с данным нарушением;
- 3) исследовать, имеют ли данные нарушения наследственный характер.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Все методики, применённые в настоящем исследовании, были одобрены Комитетом по этике и здоровью животных Королевского Ветеринарного Колледжа в Лондоне. От всех владельцев исследуемых собак было получено письменное согласие на участие в исследовании.

ИССЛЕДУЕМЫЕ СОБАКИ

Поиск собак для исследования

С помощью заводчиков золотистых ретриверов и грумеров были установлены контакты с владельцами собак, которые имели потенциальные подобные поражения. Далее к поиску собак для исследования были привлечены ветеринарные хирурги Ветеринарной клиники Королевы Матери Королевского Ветеринарного Колледжа Лондона. Требовалось найти 12 голденов, имеющих нарушения ороговения, с учётом исключающих критериев, с учётом среднего возраста возникновения заболевания (в неделях, на основе ожидаемого показателя стандартного отклонения (SD) в 3,5, абсолютной погрешности в 2 и 95% показателя достоверности), с учётом среднего показателя образования перхоти и её пигментации (для

одной собаки этот показатель выражен суммой баллов перхоти и баллов пигментации по всем частям тела, с учётом ожидаемого показателя стандартного отклонения в 30, абсолютной погрешности в 17 и 95% показателя достоверности). Была поставлена задача найти как минимум 15 собак, что позволило бы провести достоверное исследование с учётом возможных исключений. В итоге были привлечены 20 голденов, имеющих пятиколенную родословную, и у которых были выявлены нарушения кератинизации. Собаки были исследованы в Суррее практикующими ветеринарами, один из исследователей работает также в Ветеринарной клинике Королевы Матери при Королевском Ветеринарном Колледже.

Исключающие критерии

Медицинский анамнез. Собаки, имеющие нарушения метаболизма, другие кожные заболевания или длительный приём лекарственных средств, были исключены из исследования. Собаки, принимающие нестероидные противовоспалительные средства для снятия боли и воспаления при артрите и артрозе, а также принимающие антибиотики для лечения ран, были допущены к исследованию. Обработка системными инсектицидными средствами и мытьё с шампунем были также разрешены, но владельцем просили не мыть своих питомцев в течение недели перед клиническим исследованием.

Общий физический и дерматологический осмотр. Только собаки с хорошим общим физическим состоянием и нарушениями ороговения были включены в исследование. Собаки с воспалительными процессами на коже и алопецией в сочетании с избыточной перхотью были исключены.

Диагностические тесты. По требованиям исследования собаки не должны были быть заражены эктопаразитами или иметь заболевания кожи, вызванные микробами, что проверялось путём исследования под микроскопом соскобов кожи, шерсти, исследований грибковых культур на волосках шерсти и частичках кожи (посев на агаре Dermasep в Оксфорд, Бэйснгстоук, Великобритания при 26°C в течение 4 недель). Далее, для участия в исследовании было необходимо исключить любые системные заболевания, для чего были сделаны полные клинический анализ крови и биохимический анализ сыворотки крови (общий белок, альбумины, глобулины, мочевины, креатинин, общий билирубин, триглицериды, глюкоза, холестерин, щелочная фосфатаза, АЛТ, общий тироксин T4 и ТТГ) – показатели должны были быть в пределах нормы или иметь несущественные отклонения.

Контрольные образцы для патологистологического анализа и исследования при помощи электронного микроскопа. Образцы кожи, которые использовались в качестве контрольных тканей для патологистологии

и электронного микроскопного анализа, были получены от 10 собак различных пород, включая 1 золотистого ретривера, в течение 2 часов после их смерти. У этих собак не было явно выраженных заболеваний кожи, за исключением одной, у которой отмечалось диффузное поредение шёрстного покрова. Когда образцы были идентифицированы, именно у этой собаки были обнаружены патологистологические изменения, состоящие в фолликулярной дисплазии чёрных волосков; гистологические патологии были связаны с волосными мешочками (фолликулами).

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

Анамнез

Медицинский анамнез, включая возраст появления поражения, его развитие, связь со временем года, известные или предполагаемые причины проявления поражения, наличие прурита (зуда), клинические признаки, предшествующие исследования/лечение и их результаты – вся информация была собрана от владельцев. Владельцев также попросили оценить тяжесть состояния по 10-балльной шкале, где 0 – нет видимой перхоти (роговых частиц) и 10 – несколько видимых слоёв роговых частиц на шёрстном покрове, в три различных момента: в день исследования, в лучшем состоянии и в худшем состоянии.

Оценка поражений

Распространённость и тяжесть состояния были оценены в 36 различных местах: морда, уши (левое и правое, снаружи и изнутри), шея (верхняя часть, нижняя, левая и правая стороны), грудная клетка (верхняя часть, левая и правая стороны), поясничный отдел спины, левый и правый бока, промежность, хвост сверху и снизу, все четыре конечности (сбоку и изнутри), все четыре лапы, левая и правая подмышка, грудина, пах слева и справа, живот. Для каждой части тела отслоение роговых частиц и их пигментация были оценены по шкале от 0 до 3:

1. Отслоение роговых частиц:

- а) Средний размер частиц – 0: отсутствуют; 1: ≤ 2 мм; 2: от 2 до 5 мм; 3: > 5 мм;
- б) Количество частиц на шерсти – 0: отсутствуют; 1: небольшое; 2: среднее; 3: несколько слоёв частиц;
- в) Количество частиц на поверхности кожи – 0: отсутствуют; 1: небольшое; 2: среднее; 3: толстый слой частиц на поверхности кожи.

Максимальный возможный балл для участка тела составляет 9.

2. Пигментация:

- а) Пигментация частиц – 0: белые; 1: светло-серые/светло-коричневые; 2: пёстрые темно-серые/коричневые; 3: пёстрые чёрные/темно-коричневые;
- б) Пигментация кожи – 0: белая; 1: светло-серая/светло-коричневая; 2: темно-серая/коричневая; 3: чёрная.

Максимально возможный балл для участка тела составляет 6.

Анализ результатов оценки поражений

Симметричность поражений оценивалась сравнением баллов, полученных с левой и правой сторон, используя парный *t*-тест. При отсутствии существенных различий показатели симметричных участков тела (внутренняя и внешняя сторона левого и правого уха, левая и правая сторона шеи, грудной клетки, бока, передние и задние конечности, передние и задние лапы (как внутренняя, так и наружная сторона), левая и правая подмышка, левая и правая сторона паха) сводились к среднему значению.

Соотношения между размером частиц перхоти, количеством на коже и на шёрстном покрове были оценены с использованием относительного теста Пирсона. Коэффициент Пирсона составил более 0.9, баллы, используемые для оценки этих трёх параметров, были сведены в единую таблицу баллов с оценками от 0 до 9 для каждого участка тела. Соотношение между пигментацией частиц и пигментацией кожи были проанализированы таким же образом, и результаты сведены в единую таблицу «пигментации» со шкалой от 0 до 6 для каждого участка тела. Баллы по размеру-количеству частиц и пигментации были также выражены в процентном отношении, составив, соответственно, максимальные значения в 207 и 138.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ

ИССЛЕДОВАНИЯ

Биопсия кожи

Биопсия была использована для того, чтобы получить образцы кожи для гистологического (все собаки с поражениями и контрольные собаки – три места: верхняя часть, сбоку и нижняя часть грудной клетки – рис. 1, один 6 мм образец с каждого участка) и ультраструктурного (три поражённых и две контрольные собаки – боковая сторона грудной клетки, 2 пробы по 4 мм со снятием гиподермы и большей части дермы для получения образца объёмом примерно в 1 мм³) исследований, использовалась местная анестезия гидрохлоридом лидокаина 2% с адреналином 0,001%. Для подготовки участков для взятия биопсии были только аккуратно сострижены ножницами волоски шерсти, и было сделано всё, чтобы не нарушить поверхность кожи. В случае необходимости применялась лёгкая седация медетомидином хлоридом 0,01 мг/кг⁻¹ внутривенно; для снятия действия седативного вещества использовался внутримышечно атипамезол 0,05 мг/кг⁻¹.

Гистологическая оценка

Материал биопсии был зафиксирован в 10%-й забуференный формалин. Затем образцы были залиты парафином, и срезы (3–4 μ m) были окрашены гематоксилином и эозином с использованием автоматической системы окрашивания.

Все образцы были исследованы вслепую тремя из исследователей (ДШ, АХ и МКК). Образцы от контрольных собак были исследованы первыми и использовались для определения нормальных показателей для каждого участка (верх, бока и низ

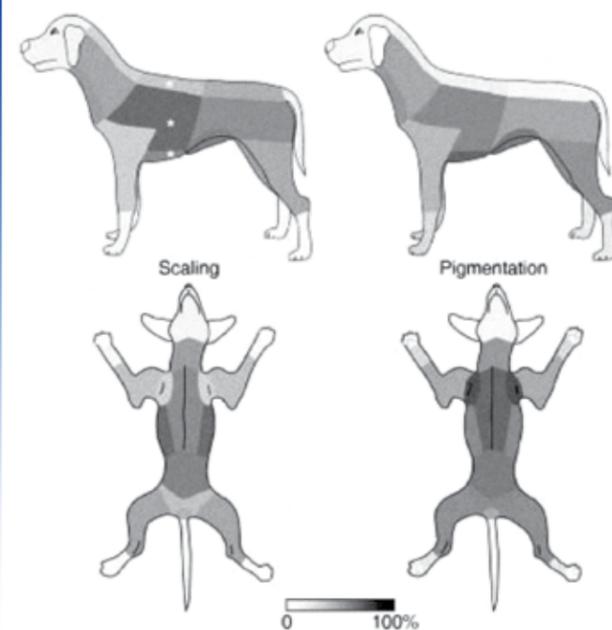


Рисунок 1.

Карта поражений кожи, на которой представлены тяжесть степени образования перхоти и степень пигментации на различных участках тела, выраженные в процентах от максимально возможного балла как различные оттенки серого цвета: от 0 (белый цвет) до 100 (чёрный цвет). Звёздочками обозначены места забора биопсии.

грудной клетки). Затем были исследованы биопсии, полученные от поражённых собак, и изменения зафиксированы в стандартизированной форме для следующих структур:

1. Роговой слой – наличие паракератоза (отсутствие, участками или полностью), роговые частицы, гиперэозинофилия, компактный кератин (отсутствие, менее 50% поверхности, 50% поверхности и более) и пигментация (отсутствие, участками или полностью).
2. Остальные слои эпидермиса – наличие утолщений (отсутствие, участками или полностью), пигментация (отсутствие, участками или полностью), воспалительные процессы (отсутствие, участками или полностью) и природа воспалительного процесса.
3. Дерма – наличие воспалительного процесса (отсутствие, лёгкий, средний или тяжёлый), его распространение (поверхностное, возле придатков кожи или глубокое) и природа воспалительного процесса.
4. Придатки кожи – наличие фолликулярного кератоза или любой другой патологии волосяных фолликулов, наличие сальных и потовых желез.
5. Гиподерма – любые патологии.

Ультроструктурные исследования на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЕМ)

Сразу после взятия образцов материал биопсии был зафиксирован в свежеприготовленном растворе 4%-го параформальдегида, 2%-го глутаральдегида в 0,1 м забуференного натрия какодилата (pH 7,4) на 48 часов при t 4°C. После промывания в буфере каждая биопсия была микротомирована, и один срез из каждой был зафиксирован в 0,5% RuO₄ и 1% OsO₄ в 0,1 м забуференного натрия какодилата (pH 7,4) при 4°C. Образцы затем были промыты, высушены и залиты агаровой смолой низкой вязкости. Ультратонкие срезы (70 нм толщиной) были смонтированы на медные сеточки с углеродным покрытием (слот 2x1 мм) и исследованы при помощи микроскопа Philips CM12 TEM (Philips Electronics, Эйндховен, Нидерланды) при 80 кВ.

Генетические исследования

Пятиколенные родословные были получены от владельцев или с сайта базы данных родословных 460000 золотистых ретриверов, рождённых в Великобритании. Группа контрольных собак соответствующего возраста и пола была выбрана с этого сайта. Для каждого исследуемого случая на сайте был проведён поиск собак того же пола и с той же датой рождения. Одномётники поражённых собак были исключены из списка. Контрольные собаки были выбраны произвольным путём из этого списка, используя генератор произвольных чисел (Microsoft Office Excel@2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Коэффициент инбридинга был вычислен для всех поражённых и контрольных собак при помощи Breeders Assistant Pedigree Software. Коэффициенты инбридинга были вычислены на основе восьми поколений предков и при помощи уравнения Райта. Уровни инбридинга в группе поражённых собак и в контрольной группе сравнивались с применением непараметрического теста Манна-Уитни, наиболее подходящего для сравнения коэффициентов инбридинга.

Генетическое древо было построено, используя программу Pedigree-Draw для Os/X (версия 6.0, Jurek Software of Cottage Grove, WI, USA). Среди собак, принимающих участие в клиническом исследовании, девять были выбраны в качестве пробандов. Информация о фенотипе родственных животных была получена от владельцев и/или заводчиков сибсов и предков. Собаки считались поражёнными (имеющими патологию) в том случае, если 1) владельцы подтверждали, что их собаки имеют явную перхоть без видимых на то причин, и если владельцы описывали состояние, сходное тому, которое имеют собаки, принимающие участие в клиническом исследовании; 2) данную собаку видел владелец поражённой собаки и может подтвердить, что обе собаки имеют похожие патологии. В том случае, если у родственной собаки не отмечалось образование перхоти или получить информацию о данной собаке было невозможно, фенотип описывался, соответственно, как «без поражений» или «неизвестный».

Генетическое древо было зрительно исследовано для получения системы поражённых собак, совместимой с каким-либо специфическим типом наследования. Простой сегрегационный анализ был проведён, принимая во внимание только те помёты, в которых была хотя бы одна поражённая собака, и без учёта собак с неизвестным фенотипом.

Гипотеза о рецессивном типе наследования проверялась путём оценки частоты сегрегации и калькуляции тестовой статистики $Z^2(Z^2=(p-p_0)^2/\{Est.Var.(p)\})$, где p – подсчитанная частота сегрегации, $Est.Var.(p)$ – её подсчитанное варьирование и p_0 – реальное значение p , которое составляет 0,25 в данном типе наследования. Рецессивный тип наследования может быть признан в том случае, если $Z^2 < 3,84$ и ожидаемая частота сегрегации $p \pm SD$ включает значение 0,25.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистические тесты, указанные в предыдущих разделах, проводились с использованием SPSS@ 14/0 для Windows@ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Уровень $P < 0,05$ был использован, чтобы указать на статистически значимую разницу. Расчёты размера образцов велись при помощи Win Episcopo версия 2.0 (de Blas N, Ortega C, Frankena K, Noordhuizen K, Trushfield M, CLIVE, Эдинбург, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 20 собак, которые были выбраны для исследования, три были исключены по причине медикаментозного лечения (длительное применение глюкокортикоидов, витамина А) или отсутствия клинических признаков. Одна собака в течение трёх лет проходила курс лечения в связи с гипотиреозом. Однако по медицинским записям было установлено, что появление перхоти было отмечено за три года до постановки диагноза «гипотиреоз», поражение кожного покрова сохранялось всё это время, в то время как другие клинические признаки исчезли благодаря лечению; поэтому эти два проявления были расценены как несвязанные друг с другом, и данная собака была включена в список (собака 3). Ещё три собаки получали медикаментозное лечение во время клинического исследования: собака 3 получала 1,2 мг таблетку L-тироксина один раз в день (Soloxine®, Arnolds, Shropshire, UK), собака 8 получала мелоксикам (Metacam®, Boehringer Ingelheim Ltd, UK) по причине хронического артрита и собака 12 получала антибиотик из-за недавней травмы когтя. Все три собаки были включены в список.

Таким образом, 17 собак с поражениями кожи, принадлежащие 12 различным владельцам, были включены в исследование.

КЛИНИЧЕСКИЕ ЧЕРТЫ

Анамнез

Возраст и пол собак, принимавших участие в исследовании, возраст проявления поражения кожного покрова приведены в таблице 1. Из 17 собак – 7 кобели и 10 суки. На момент исследования их возраст составлял от 8 месяцев до 9 лет и 9 месяцев.

Средний возраст появления признаков поражения, со слов владельцев, составляет 13 недель (от 0 до 4 лет). Из 17 собак у девяти (53%) проявились клинические признаки поражения в возрасте 3 месяцев, у 11 собак (65%) – до шести месяцев, и у 13 (76%) – до одного года. Продолжительность болезни на момент исследования составляла от 17 недель (собака 13) до 8,7 лет (собака 5).

В трёх случаях (собаки 1, 3 и 12) владельцы отмечали отсутствие изменений в тяжести состояния. В 14 случаях, когда имели место изменения состояния, 8 собак исследовались в состоянии средней для них тяжести

(собаки 2, 6, 9, 11 и с 14 по 17); три собаки были исследованы в момент, когда их состояние близко или является лучшим для них (собаки 4, 5 и 7); и три собаки находились близко или в худшем для них состоянии (собаки 8, 10 и 13). Также для шести собак владельцы отмечали наличие факторов, ухудшающих состояние (собаки 4, 5 и 14: линька, собаки 8 и 10: сезонные изменения, собака 13: выкармливание помёта). Собака 8 была единственной, у которой отмечался прурит (зуд). Различные виды лечения применялись к семи собакам (кератолитические, кератопластические или антимикробные шампуни, увлажняющие кондиционеры, системные антибиотики, добавки с маслом энотеры, с маслом печени трески, различные витамины, включая витамин А и китайские травяные средства) без какого-либо длительного улучшения.

Отмеченный возраст первого появления перхоти * – перхоть присутствует с рождения.

| № | Возраст во время исследования | Пол | Возраст появления перхоти |
|----|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1 | 9 месяцев | Стерилизованная сука | 8 недель |
| 2 | 4 года и 7 месяцев | Сука | 12 недель |
| 3 | 9 лет и 9 месяцев | Кастрированный кобель | 4 года |
| 4 | 3 года и 11 месяцев | Сука | 6 месяцев |
| 5 | 8 лет и 8 месяцев | Сука | 0* |
| 6 | 4 года и 8 месяцев | Кобель | 9 месяцев |
| 7 | 6 лет и 6 месяцев | Сука | 2 года |
| 8 | 6 лет и 7 месяцев | Стерилизованная сука | 3 года |
| 9 | 1 год и 7 месяцев | Кастрированный кобель | 8 недель |
| 10 | 8 лет | Кобель | 12 недель |
| 11 | 1 год и 3 месяца | Кобель | 5 недель |
| 12 | 8 месяцев | Сука | 5 недель |
| 13 | 3 года и 4 месяца | Сука | 3 года |
| 14 | 4 года и 1 месяц | Кобель | 10 месяцев |
| 15 | 3 года и 7 месяцев | Сука | 7 недель |
| 16 | 1 год и 5 месяцев | Сука | 6 месяцев |
| 17 | 1 год и 5 месяцев | Кобель | 13 недель |

Поражения кожи

Поражения кожи заключались только в избыточном образовании перхоти и гиперпигментации, за исключением собаки 7, у которой также была выявлена межпальцевая эритема в мягкой форме. Поражения кожи были широко распространены по всей поверхности тела, но во всех случаях нос и подушечки лап не были затронуты. Ушные каналы были без поражений, за исключением собаки 4, у которой был отмечен рост ушной *Malassezia*, однако владелец этой собаки не отмечал никаких характерных клинических признаков, и собака не получала никакого специфического лечения. Симметричность поражений была подтверждена отсутствием существенных различий между баллами, полученными на левой и правой стороне вне зависимости от участка тела и тестируемого критерия (спаренный t -тест, $P \geq 0,05$ для всех собак).



Рисунок 2. Чешуйки перхоти на коже с боковой стороны грудной клетки. Степень поражения 5 (56%), размер чешуек = 2, количество чешуек на шерсти = 0, количество чешуек на коже = 3. Степень пигментации 3 (50%), при пигментации чешуек = 2 и пигментации кожи = 1.



Рисунок 5. Различия в степени пигментации чешуек: слева – степень 3, справа – степень 1. Обратите внимание на большой размер обеих чешуек (степень = 3).



Рисунок 3. Большие, плоские и пигментированные чешуйки, отстающие от кожи. Степень поражения 7 (78%), при размере чешуек = 3, количестве чешуек на шерстяном покрове = 1, количестве чешуек на коже = 3. Степень пигментации 5 (83%), при пигментации чешуек = 2 и пигментации кожи = 3.



Рисунок 4. Большие, плоские и пигментированные чешуйки перхоти на шерстяном покрове. Количество чешуек на шерсти = 3 и пигментация чешуек = 3.

Разница в проявлении клинических признаков для различных участков тела

Результатам исследований были присвоены баллы, характеризующие наличие частиц перхоти и пигментации для различных участков тела. Рис. 1 является иллюстрацией этой разницы

Образование перхоти. Большие и плоские чешуйки присутствовали на коже (рис. 2 и 3), но также и на шерстяном покрове (рис. 4). Их размер варьировался от 1 и 2 мм до 13 мм (рис. 5) и был напрямую связан с количеством частиц перхоти (коэффициент Пирсона 0,97, связь является существенной при уровне 0,01). Подобным же образом количество частиц, обнаруженных на шерстяном покрове, чётко связывалось с количеством частиц, обнаруженных на коже (коэффициент Пирсона 0,98, связь является существенной при уровне 0,01).

Образование чешуек перхоти было наиболее выражено по бокам грудной клетки, на боках, на груди и животе (56–66% от максимального балла). Оно было менее выражено, но легко заметно сбоку и снизу шеи, на поясничном отделе, в промежности и на задних конечностях (44–50%). Верхняя часть шеи и грудной клетки, передние конечности и пах были поражены незначительно (31–39%), тогда как морда, наружная и внутренняя поверхность ушей, хвост и лапы практически не были затронуты или были нормальными ($\leq 16\%$).

Пигментация. Пигментация чешуек связана напрямую с пигментацией кожи (коэффициент Пирсона 0,9, связь является существенной при уровне 0,01). Пигментация варьируется в зависимости от исследуемого участка тела (рис. 5): она особенно выражена в области подмышек, грудины, живота, боков грудной клетки, в паху, на передних конечностях и нижней части шеи (52–73% от максимального балла); она была менее выражена, но легко заметна на левой и правой сторонах шеи, на боках и задних конечностях (41–48%), и слабо выражена на верхней части шеи, верхней части грудной клетки и лапах (16–28%); на всех остальных участках тела была совсем слабая (поясничный отдел, верхняя часть хвоста: 10–13%) или отсутствовала (уши, нижняя часть хвоста: $\leq 3\%$).

Сводная таблица степени образования перхоти и степени пигментации для каждой собаки, а также средние показатели, выраженные в процентах от максимально возможного количества баллов.

| Собака № | Степень образования перхоти | Степень пигментации |
|------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 1 | 16% | 3% |
| 2 | 41% | 38% |
| 3 | 63% | 44% |
| 4 | 6% | 9% |
| 5 | 43% | 42% |
| 6 | 41% | 34% |
| 7 | 12% | 25% |
| 8 | 33% | 46% |
| 9 | 23% | 28% |
| 10 | 68% | 58% |
| 11 | 37% | 45% |
| 12 | 58% | 62% |
| 13 | 40% | 37% |
| 14 | 11% | 25% |
| 15 | 35% | 36% |
| 16 | 28% | 33% |
| 17 | 35% | 46% |
| Среднее значение | 35% | 36% |
| Стандартное отклонение | 18% | 15% |

Баллы степени образования чешуек перхоти и баллы пигментации в основном соотносятся по всем участкам тела (коэффициент Пирсона 0,76, связь является существенной при уровне 0,01). Однако разногласия возникли для участков подмышек и паха, где явно выражена гиперпигментация (процент от максимально возможного балла соответственно 73 и 57%), но степень образования перхоти является небольшой (31 и 39% соответственно).

Разница в степени образования перхоти и пигментации между различными собаками. Показатели по степени образования перхоти и выраженности пигментации для каждой из исследуемых собак сведены в таблице. Очевидно, что среди всех собак, включённых в исследование, степени образования перхоти и пигментации будут значительно различаться. Тем не менее эти два показателя взаимосвязаны (коэффициент Пирсона 0,85, связь является существенной при уровне 0,01).

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Результаты гистопатологического исследования в сравнении с контрольными собаками представлены на рис. 6.

Роговой слой (верхний слой эпидермиса)

Паракератоз не был обнаружен. Компактный ортокератозный кератин был обнаружен в 46 образцах (рис. 6b, d, e, g), занимая более 50% поверхно-

сти за одним исключением. Это было отмечено как минимум на двух из трёх участков тела для всех собак, кроме одной (собака 7). На роговом слое была в основном отмечена гиперэозинофилия (рис. 6b, d, e, g); это было отмечено на образцах со всех трёх участков тела и как минимум – на двух из трёх участков для каждой собаки.

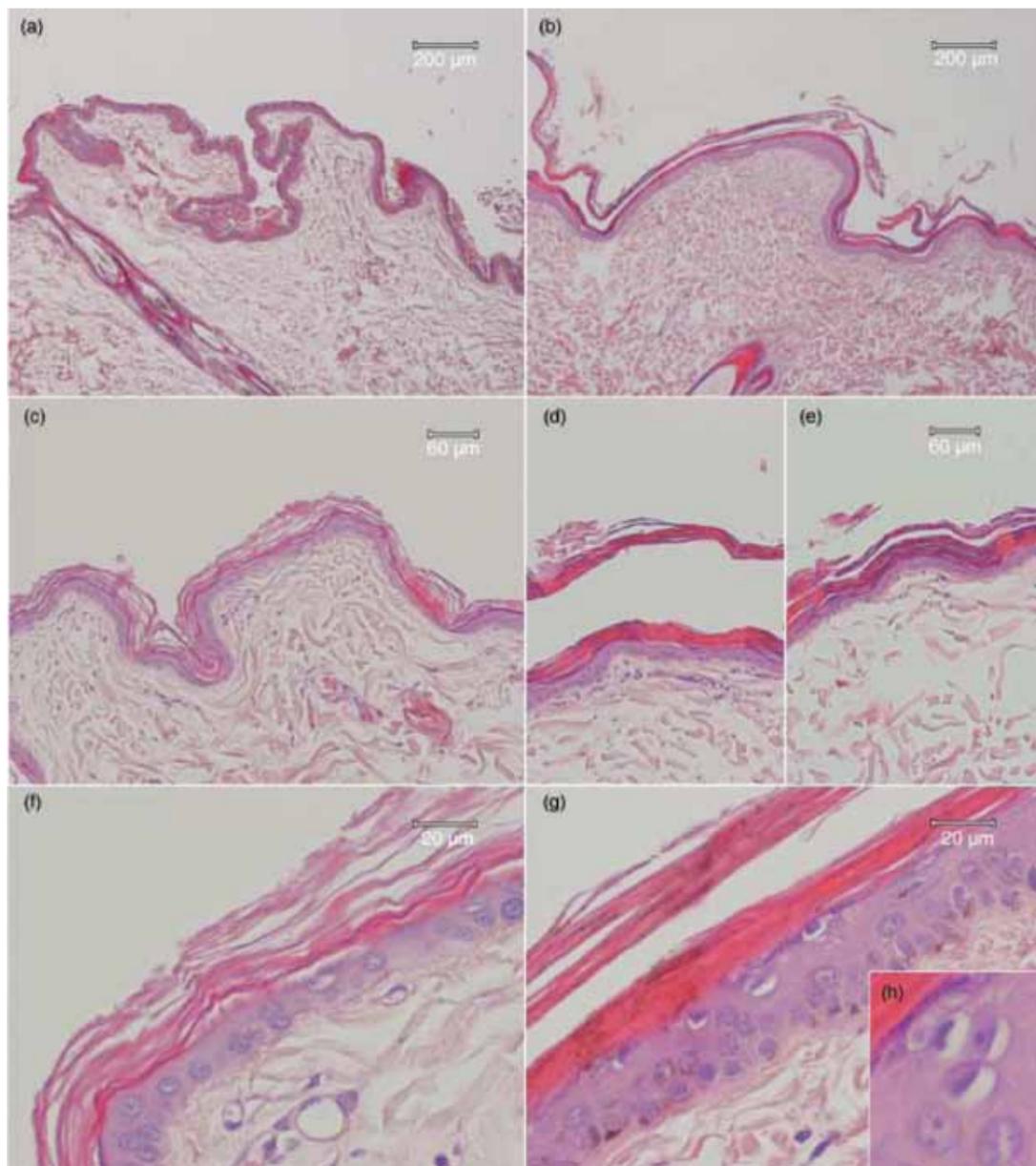
Наличие чешуек перхоти (рис. 6b, d) было отмечено на 34 образцах, в основном – на образцах, взятых с нижней части тела. Чешуйки перхоти не были обнаружены ни в одном из трёх образцов для одной собаки (собака 7); чешуйки были обнаружены только в одном образце для четырёх собак (образец, взятый сбоку: собаки 4 и 14; образец, взятый снизу: собаки 1 и 13). Гиперпигментация рогового слоя присутствовала в 38 образцах (рис. 6 g); она была участками (пятнами) во всех этих образцах, кроме одного, чаще отмечалась на образцах, взятых снизу и сбоку. В двух случаях это поражение отмечалось только на образцах, взятых с нижней части туловища (собаки 4 и 13).

Остальные слои эпидермиса

Оказались слегка утолщёнными в 30 образцах (рис. 6b, g); утолщение было участками в 20 образцах и полным – в остальных 10. Акантоз не обязательно был связан с наличием и степенью гиперэозинофилии рогового слоя и наблюдался на образцах, взятых со всех трёх сторон. Только у одной собаки был обнаружен акантоз во всех трёх образцах (собака 17). Гиперпигментация была отмечена на 38 образцах биопсии (рис. 6g), взятых, в основном, сбоку и снизу, и была в большей степени участками (пятнами) и между фолликулами; однако она более выражена с нижней стороны туловища, чем с двух других сторон. В эпидермисе как контрольных собак (рис. 6f), так и золотистых ретриверов с поражениями рогового слоя (рис. 6g, h), были обнаружены неидентифицируемые вакуолизированные в разной степени клетки со сморщенным базофильным ядром, эти клетки обнаруживались в верхней части шиповатого слоя сразу под зернистым слоем в тех случаях, где он имелся. Тем не менее более 5 вакуолизированных клеток на образец биопсии (рис. 6g, h) были обнаружены в 42 образцах (79%), взятых со всех трёх участков у большинства собак, в то время как более 5 вакуолизированных клеток были отмечены только в 22% контрольных биопсий. Эта разница в пропорциях является существенной (57,5%, 95% интервал достоверности (ИД) 31–74%). Воспалительные процессы в эпидермисе оказались редкими (шесть образцов) и даже в случае их наличия имели во всех этих образцах лёгкий и локализованный характер.

Дерма

Воспалительные процессы в дерме были обнаружены в 18 образцах (10 собак), в основном – с боков и с нижней стороны. На 14 срезах воспаление было отмечено в поверхностных слоях дермы, на остальных четырёх срезах воспаление было отмечено на поверхности дермы и в придатках кожи. Воспаление было оценено как лёгкое в 14 биопсиях и как среднее – в 4 биопсиях. Инfiltrат был мононуклеарный, за исключением трёх срезов из образцов, взятых с боков, в которых в инfiltrате были ещё нейтрофилы. Наличие воспалительного инfiltrата в дерме не всегда сопровождалось акантозом.

**Рисунок 6.**

Сравнительные фотомикрографии нормального эпидермиса собаки (а, с и f) и эпидермиса поражённых золотистых ретриверов (b, d, e, g и h). Гематоксилин и эозин.

В сравнении с контрольными образцами очевиден компактный эозинофильный ортокератоз (b, d, e и g). Образование чешуек видно на фотографиях b и d. Фотография g показывает роговой слой и гиперпигментацию Мальпиги. На некоторых биопсиях присутствует лёгкий локальный акантоз (b и g). Вакуолизованные клетки могут быть обнаружены в контрольном образце (f), но их гораздо больше в поражённой коже (g и h).

Придатки кожи и гиподерма

Состояние придатков кожи и гиподермы во всех образцах было оценено как норма.

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (ТЭМ)

В роговом слое здоровой кожи, в трёх-четырёх верхних слоях, корнеоциты были несцепленными, а корнеодесмосомы практически не наблюдались (рис. 7а). У поражённых ретриверов корнеоциты оставались сцепленными, и корнеодесмосомы были гораздо более многочисленными (рис. 7б).

Генетический анализ

Коэффициенты инбридинга 17 поражённых собак варьируются от 0,9 до 9,1% (средний – 5,5, 95% ИД: 4,2–6,8); коэффициенты контрольных 17 собак составляли от 2,3 до 14,5% (средний – 7,2, 95% ИД: 5,5–9,1). Средние значения для обеих групп различаются незначительно (тест Манна-Уитни, $P=0,18$).

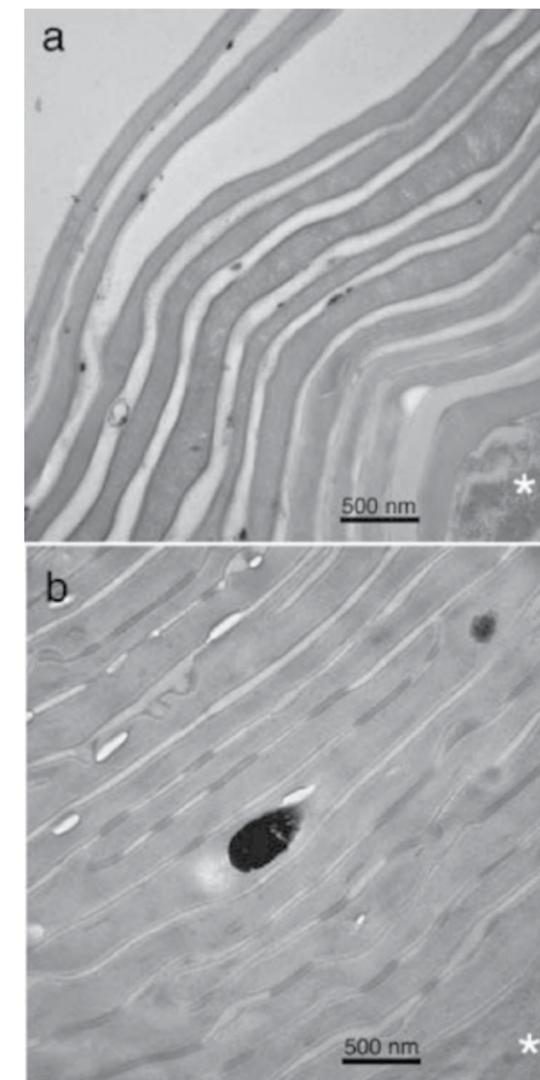
Комплексное фамильное древо, охватывающее четыре поколения собак, было построено на основе родословных девяти изученных в ходе данного исследования собак (рис. 8). Оно включает в себя 95 особей, из которых 23 собаки имеют поражения рогового слоя кожи и 19 – имеют неизвестный фенотип.

То, что больные собаки сосредоточены среди близких родственников, и большинство из них живут не в одной и той же среде, позволяет предположить наличие сильного наследственного фактора в появлении нарушений кератинизации. Наличие нескольких поражённых сибсов не поддерживает идею новой мутации. Если исходить из моногенного наследования в соответствии с законами Менделя, то схема поражённых индивидов несовместима с простым аутосомно-доминантным или Х-сцепленным типом наследования, также она несовместима с митохондриальным наследованием. Большое число поражённых потомков от одного поражённого и одного здорового производителей заставляет думать о том, что здесь маловероятно дигенное или олигогенное наследование. Наиболее совместимые типы наследования – аутосомно-рецессивный или, возможно, аутосомно-доминантный с переменной пенетрантностью. Гипотеза аутосомно-рецессивного типа наследования проверялась с использованием сегрегационного анализа. Всего в список были включены 63 потомка из 10 помётов, в которых была хотя бы одна поражённая собака. При $Z^2=1,23$ ($P>0,2$) и сегрегационной частоты $0,32\pm 0,07$ это соответствовало простому рецессивному типу наследования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поражения, связанные с нарушением кератинизации у золотистых ретриверов, проявляются в молодом возрасте, вне зависимости от пола. Состояние может быть стабильным или периодически улучшаться или ухудшаться. Клинически оказываются непоражёнными нос, подушечки лап и ушные проходы, поражения рогового слоя проявляются в виде больших плоских и по-разному пигментированных чешуек перхоти, обнаруживаемых на шерсти и коже, которая сама по себе может быть в разной степени гиперпигментирована. Распространение поражённых участков симметрично, как правило, это бока и нижняя часть туловища. Степень тяжести состояния варьируется в зависимости от конкретной собаки, но есть общая схема распространения поражений. Степень образования перхоти хорошо связана с интенсивностью пигментации за исключением участков подмышек и паха, где при сильной пигментации перхоти образуется не так много; это разногласие может быть объяснено тем, что на этих участках тела чешуйки перхоти (даже если их образуется много) быстро удаляются механически за счёт трения.

Для решения задач настоящего исследования было бы предпочтительно сравнить патологистологию поражённых собак с патологистологией нормальной кожи здоровых золотистых ретриверов, а не с образцами, взятыми у собак разных пород. Однако в силу ограничений, накладываемых действующим законодательством, было невозможно получить биопсию от здоровых собак, находящихся в частном владении, поэтому образцы здоровой кожи были взяты сразу же после смерти собак, подвергшихся эвтаназии по различным причинам, но не имевших проблем со здоровьем, которые могли бы повлиять на состояние и функции кожного покрова. Исследование продолжалось несколько месяцев, за это время только один труп золотистого ретривера был доступен для анализа. Несмотря на различные баллы оценки поражений у разных собак и на разных участках тела, во всех случаях наблюдается характерная компактная структура и гиперэозинофильное окрашивание рогового слоя на образцах биопсии с боков и нижней ча-

**Рисунок 7.**

Трансмиссионная электронная микрография показывает роговой слой нормальной кожи (а) и поражённой (b). Звёздочки обозначают кератиноциты в верхней части зернистого слоя. В нормальной коже, в ближайших трёх-четырёх слоях корнеоциты не сцеплены, и корнеодесмосомы едва обнаруживаются. В поражённой коже корнеоциты остаются сцепленными, а корнеодесмосомы более многочисленны.

сти туловища. В то время как это представляется наибольшей патологией в окрашенных гематоксилином и эозином и зафиксированных формалином образцах кожи поражённых собак, наличие чешуек перхоти менее заметно. Возможно, что те чешуйки, которые наблюдались в момент взятия образцов, отделились во время транспортировки или обработки.

Локальное распределение гранул пигмента, которые появляются в межфолликулярном пространстве, как в роговом слое, так и в более глубоких слоях эпидермиса, соответствует пятнистости чешуек перхоти и кожи, которые наблюдаются в большинстве случаев.

Хотя во многих биопсиях от здоровых собак могут быть обнаружены в верхней части шиповатого слоя неопределяемые вакуолизованные клетки со сморщенным базофильным ядром, они гораздо многочис-

Дефекты кератинизации у золотистых ретриверов

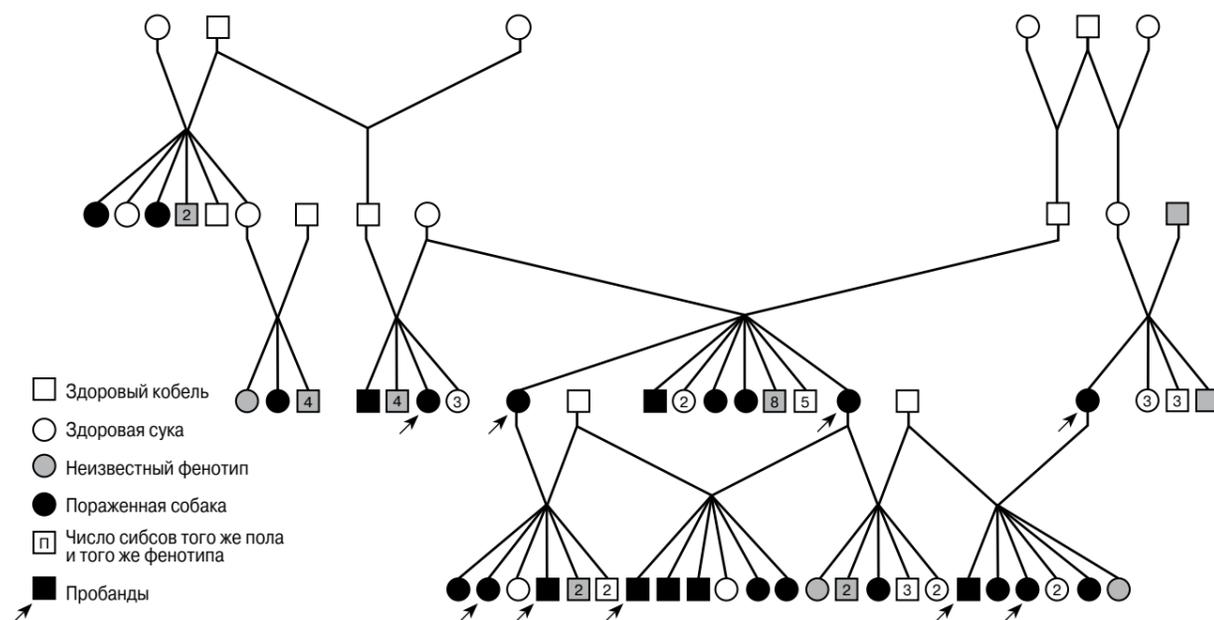


Рисунок 8.

Родословная 95 золотистых ретриверов с наследственным дефектом кератинизации. Двадцать три собаки поражены, 19 имеют неизвестный фенотип.

леннее в большинстве образцов от поражённых собак. Эти наблюдения в целом соответствуют описанному Mauldin и др. Утолщение эпидермиса и точечные воспалительные процессы в эпидермисе и дерме могут сопровождать большинство гистопатологических особенностей. В случае воспаления изменения имеют незначительный характер. Можно предположить, что нарушения кератинизации связаны с ухудшением функционального состояния эпидермального барьера, что находит отражение в этих воспалительных процессах.

Этиологию нарушений кератинизации у золотистых ретриверов ещё предстоит определить. Возраст появления этих дефектов рогового слоя у золотистых ретриверов, а также родственные связи между поражёнными собаками являются примечательными чертами этого патологического состояния и наводят на мысль о том, что в его основе лежит генетический дефект. В нашем примере уровень инбридинга был достаточно низким, и он не объясняет родственной концентрации больных собак. Кроме того, отсутствие полной информации по фенотипам внутри помётов добавляет неточности в анализ родословных, аутосомно-рецессивный тип наследования по Менделю может быть выведен и родственной схемы поражённых собак в составленном фамильном древе. Эта гипотеза была поддержана сегрегационным анализом. Тем не менее, аутосомно-доминантный тип с неполной пенетрантностью или олигогенный типы наследования не могут быть исключены. Помимо этого выраженное образование перхоти у поражённых собак является очевидным даже для неподготовленного взгляда, но для тех собак, чей фенотип определялся владельцами, а не путём клинического исследования, в случае лёгких поражений могла иметь место ошибочная классификация, что

также могло сказаться на результатах общего анализа данных. Наконец, доказательство типа наследования требует исследований разведения, идентификации связанных маркеров через анализ взаимосвязей или идентификации специфической каузативной мутации.

Была предложена классификация наследственной ихтиозоподобной болезни кожи у собак как эпидермолитической и неэпидермолитической. По своим клиническим и патологистологическим характеристикам нарушение кератинизации у золотистых ретриверов подпадает под неэпидермолитическую категорию. Неэпидермолитический кератоз был также описан у керн терьеров, джек рассел терьеров и американских бульдогов. Упоминания и описания частных или редких случаев есть для вест хайланд терьеров, мягкошёрстных пшеничных терьеров, питбультерьеров, австралийской овчарки и ротвейлера. Описанные поражения кожи имеют гетерогенный характер по своим клиническим проявлениям и описанным структурным чертам, они значительно отличаются от патологического состояния, которое наблюдается у золотистых ретриверов и описано в настоящей статье.

Гистологическое обнаружение компактного кератина, практически при отсутствии акантоза, соотносится с ультраструктурным исследованием, в котором наблюдается в роговом слое наличие сцепленных корнеоцитов и значительного количества десмосом, что позволяет предположить патологию в процессе отслоения клеток рогового слоя, обусловленную замедленным распадом корнеодесмосом. Эти черты также наблюдаются на коже мышей, обработанной сульфатом холестерина, – метод, используемый для исследования роли избытка сульфата холестерина в патологическом механизме наследования человеком X-сцепленного ихтиоза

(RXLI). На самом деле, обычное утолщение эпидермиса с компактным ортокератозом и переменной вакуолизацией над базальным слоем, а также наличие корнеодесмосом в верхней части рогового слоя являются чертами RXLI. Сходство клинических признаков описываемого нарушения кератинизации с человеческим RXLI включает образование чешуек, которые могут быть незаметны при рождении, но проявляются уже в детском возрасте, большие гиперпигментированные чешуйки, которых нет на лице, ладонях и подошвах. При RXLI дефицит стероидной сульфатазы приводит к накоплению сульфата холестерина в коже и других тканях. Накопленный избыточный сульфат холестерина, как считается, различным образом способствует замедлению разрушения корнеодесмосом при RXLI, например, ингибируя сывороточные протеазы рогового слоя. Хотя у собак ген стероидной сульфатазы также расположен в X-хромосоме, у больных ретриверов нет очевидной связи с X-сцепленным наследованием, т.е. эти два заболевания не являются аналогичными. Тем не менее, механизм обновления рогового слоя является сложным, можно предположить, что дефицит или ингибирование специфических для рогового слоя протеаз или глюкозидаз каким-либо другим механизмом приводит к замедлению обновления рогового слоя у золотистых ретриверов.

В заключение настоящее исследование описывает клинически и патологистологически нарушения кератинизации, характерные для золотистых ретриверов, эти нарушения появляются у молодых собак обоих полов и характеризуются обильным образованием чешуек перхоти, в основном на боках и нижней части туловища, а также гиперпигментацией тела и патологистологическими и ультраструктурными изменениями в роговом слое. Предлагается генетическая этиология, поставлен вопрос о простом аутосомно-рецессивном типе наследования.

Благодарность

Данное исследование было поддержано грантом Dogs Trust и стало возможным благодаря сотрудничеству владельцев поражённых собак. Мы благодарны Шармен-Эннис Уиллан и Энн Таггарт за помощь в поиске поражённых золотистых ретриверов для исследования, Эйлин Кейсли, владелице базы данных золотистых ретриверов Standfast Pedigree Database, Колину Мэннингу – производителю Breeder Assistant Software за помощь в сборе данных по родословным, а также Марии Битнер-Глиндиц за её советы.

Перевод: И. Алексеева

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Guaguère E, Bensignor E. Troubles génétiques de la cornéogenèse: deux exemples: ichthyoses et kératodermies naso-plantaires. In: GEDAC, ed. Proceedings of the XXth annual meeting of the Groupe d'Etude en Dermatologie des Animaux de Compagnie. Disneyland® Resort Paris: Groupe d'Etude en Dermatologie des Animaux de Compagnie, 2006; 42–6.
- Hall JA, Yager J. Diagnostic dermatology. Canadian Veterinary Journal 2004; 45: 874.
- Barnhart KF, Credille KM, Ambrus A et al. A heritable keratinization defect of the superficial epidermis in Norfolk terriers. Journal of Comparative Pathology 2004; 130: 246–54.
- Credille KM, Barnhart KF, Minor JS et al. Mild recessive epidermolytic hyperkeratosis associated with a novel keratin 10 donor splice-site mutation in a family of Norfolk terrier dogs. British Journal of Dermatology 2005; 153: 51–8.
- Franzblau A. A Primer of Statistics for Non-Statisticians. New York: Harcourt, Brace & World, 1958.
- Standfast Golden retriever Pedigree Database. Available at: <http://www.standfastdata.co.uk>. Accessed 30 April 2007.
- Pedigree Software-Breeders Assistant Web site. Breeders Assistant Software. Available at: <http://www.tenset.co.uk/index.html>. Accessed 20 March 2008.
- Wright S. Coefficients of inbreeding and relationship. The American Naturalist 1922; 56: 330–8.
- Nicholas FW. Simple segregation analysis: a review of its history and terminology. Journal of Heredity 1982; 73: 444–50.
- Davie AM. The 'Singles' method for segregation analysis under incomplete ascertainment. Annals of Human Genetics 1979; 42: 507–12.
- Mauldin E., Credille K, Dunstan R et al. Clinical, histopathological and ultrastructural analysis of Golden retriever ichthyosis. Veterinary Dermatology 2007; 18: 187 (Abstract).
- Olivry T, Mason I. Genodermatoses: inheritance and management. In: Kwochka K, Willemse T, von Tscharner C, eds. Advances in Veterinary Dermatology, Vol. 3. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998: 365–8.
- Credille K, Petersen A, Song M. Heterogeneity in non-epidermolytic ichthyosis in a cat and two dogs. In: Kwochka K, Willemse T, von Tscharner C, eds. Advances in Veterinary Dermatology, Vol. 3. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998: 529–30.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Diseases with abnormal cornification. In: Skin Diseases of the Dog and the Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. Oxford, UK: Blackwell Science, 2005: 161–98.
- Lewis D, Ford M, Kwochka K. Characterisation and management of a Jack Russell terrier with congenital ichthyosis. Veterinary Dermatology 1998; 9: 111–8.
- Helman R, Rames D, Chester D. Ichthyosiform dermatosis in a soft-coated Wheaten terrier. Veterinary Dermatology 1997; 8: 53–8.
- Scott D. Congenital ichthyosis in a dog. Companion Animal Practice 1989; 9: 7–11.
- Muller G. Ichthyosis in two dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 1976; 169: 1313–6.
- Melman S, Kauffman C, Moeller R, Peck G. Abstracts of the ESDR-JSID-SID Tricontinental Meeting. Journal of Investigative Dermatology 1989; 92: 393–548.
- Sato J, Denda M, Nakanishi J et al. Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. Journal of Investigative Dermatology 1998; 111: 189–93.
- Scheimberg I, Harper JI, Malone M et al. Inherited ichthyoses: a review of the histology of the skin. Pediatric Pathology and Laboratory Medicine 1996; 16: 359–78.
- Elias PM, Crumrine D, Rassner U et al. Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI. Journal of Investigative Dermatology 2004; 122: 314–9.
- DiGiovanna JJ. Ichthyosiform dermatoses. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K et al., eds. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 5th edn. New York: McGraw-Hill, 1999: 581–7.
- Toder R, Glaser B, Schiebel K et al. Genes located in and near the human pseudoautosomal region are located in the X-Y pairing region in dog and sheep. Chromosome Research 1997; 5: 301–6.
- Milstone LM. Epidermal desquamation. Journal of Dermatological Science 2004; 36: 131–40.