

## ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КРОВИ КРОЛИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПИСТОРХОЗЕ

Сидельникова А.А.<sup>1</sup>, Начева Л.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Кемеровская Государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, Кемерово, Россия, e-mail: alieva-alevtina@mail.ru

Лейкоцитарная формула периферической крови при заражении кроликов *Opistorchis felineus* характеризовалась большим количеством сегментоядерных и палочкоядерных псевдоэозинофилов. У кроликов при данной инвазии было отмечено существенно превышающее нормальное значение количество базофильных лейкоцитов на всех сроках наблюдения. Напротив, во всех сроках эксперимента эозинофилия у кроликов, инвазированных *Opistorchis felineus*, отсутствовала. Количество лимфоцитов у них было меньше нормы. На всех сроках наблюдения встречались юные псевдоэозинофилы в небольшом количестве. Отмечен сдвиг лейкоцитарной формулы влево. Через 33 суток изменение лейкоцитарной формулы в динамике отражало общую тенденцию стремления к уменьшению отдельных показателей лейкоцитарной формулы, то есть к нормальным значениям. Соотношение количества лимфоцитов к количеству сегментоядерных псевдоэозинофилов остается немного меньше нормальных значений.

Ключевые слова: описторхоз, эксперимент, кролики, клетки крови, лейкоцитарная формула, псевдоэозинофилы

## CYTOLOGIC FEATURES BLOOD OF RABBITS IN EXPERIMENTAL OPISTHORCHIASIS

Sidelnikova A.A.<sup>1</sup>, Nacheva L.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical University Kemerovo State Medical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, Kemerovo, Russia, e-mail: alieva-alevtina@mail.ru

Peripheral blood leukocyte infection when rabbits *Opistorchis felineus* characterized by a large number of segmented and stab pseudoeozinofilov. Rabbits at this invasion was observed significantly higher than the normal value of the number of basophilic leukocytes at all stages of monitoring. On the contrary, during all stages of the experiment eosinophilia in rabbits infested *Opistorchis felineus*, was absent. The number of lymphocytes, they had smaller than normal. In all periods of observation met young pseudoeozinofily in small quantities. Marked shift in leukocyte formula to the left. After 33 days of a change in the leukocyte dynamics reflected the general trend towards a decrease of separate parameters of leukocyte formula, ie to normal. The ratio of the number of lymphocytes in the number of segmented pseudoeozinofilov is slightly smaller than normal values.

Keywords: opistorhoz experiment, rabbits, blood cells, WBC, pseudoeozinofily

За последнее время исследования влияния описторхов на организм человека некоторое внимание было уделено изменениям периферической крови. Так в рамках изучения показателей белой крови при описторхозе у людей большинство авторов указывают на развитие эозинофилии [2, 7, 8, 9]. При остром описторхозе количество эозинофилов при подсчете лейкоцитарной формулы в литературе варьирует от 10-15 до 20-40 % [2]. Другие авторы предлагают связывать число этих видов гранулоцитов с вариантами течения описторхоза (холангический, тифоподобный, бронхолегочной, гастроэнтероколический, смешанный) и составляет от 39,7 до 79, 4 % [4]. Причем, кроме этого показателя, иные не описываются. Количество эозинофилов в приферической крови связывают со степенью инвазии и временем заражения. Так, нарастание количества этих клеток отмечают с 16 по 30 день с момента заражения [3]. Описывается роль эозинофилии в острой стадии тканевых гельминтозов [8]. Несмотря на имеющиеся работы и изученность описторхоза, вопросы

изучения периферической крови у экспериментальных животных остаются недостаточно изученными. Лейкоцитарная формула, подсчитываемая при изучении периферической крови, помогает более точно дифференцировать характер процессов протекающих в организме. Исследование особенностей изменений лейкоцитарной формулы у кроликов при заражении описторхисом ранее не проводилось. Профиль лейкоцитарной формулы крови здоровых кроликов лимфоцитарный в отличие от человека [5]. Псевдоэозинофилы кролика выполняют идентичные нейтрофилам человека функции [1, 5].

### **Цель исследования**

Выяснить изменение основных показателей лейкоцитарной формулы периферической крови кроликов при экспериментальном описторхозе в динамическом наблюдении.

### **Материал и методы исследования**

Постановка эксперимента. Работа была проведена на 30 беспородных кроликах (возраст 6 месяцев). Животные получены с частного хозяйства. Перед экспериментом животные прошли адаптацию. Диета животных была одинакова, и включала брикетированное луговое сено и кормовую пшеницу, бутылированную питьевую воду. Перед проведением эксперимента все животные прошли лечение антигельминтиком альбендазолом по схеме, чтобы исключить возможность наличия другого гельминтоза. Эксперимент начинали не ранее чем через две недели после дегельминтизации. Для заражения экспериментальных кроликов метацеркариями описторхов, нами была использована зараженная рыба (видовая принадлежность – язь), которую забирали с кафедры ихтиологии и гидробиологии Томского государственного университета. В области боковой линии и спинки были взяты образцы мышечной ткани язя. При помощи компрессориума выделены живые метацеркарии *Opisthorchis felinus*. Определение количества метацеркариев проводили под микроскопом на увеличении  $\times 100$ . Заражение животных проводили путем скармливания порций мышц рыбы, содержащих по 50 живых метацеркариев для каждой особи. В качестве контроля забор периферической крови всех животных был проведен до заражения, а затем в разные сроки с момента предполагаемого заражения, а именно на 6 сутки, 27 сутки и 33 сутки. Периферическая кровь забиралась из капилляров правого уха. Предварительно ухо кролика растирали, так как отмечено в литературе, что там могут застаиваться некоторые клетки крови [5]. Забор периферической крови проводился в утренние часы, натощак. При помощи притертого стекла изготавливали по 3 мазка крови от каждого животного до заражения (контроль) и в каждый срок после заражения. Мазки крови окрашивали по стандартной методике. Фиксацию мазков крови проводили с помощью фиксатора эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду фирмы «Минимед – М-Г» ТУ 9398-004-29508133-11. Окрашивание мазков крови осуществлялось с помощью азур-эозина по Романовскому (в растворе)

ЭКОЛАБ-Гем-Романовский фирмы ЗАО «ЭкоЛаб» ТУ 9398-012-70423725-2010. Для изготовления красящей смеси использовался концентрированный фосфатный буфер  $6,6 \pm 0,2$  фирмы ООО «Минимед». Дистиллированную воду использовали бутылированную, фирмы «АКВА» г. Новосибирск. Исследование мазков крови проводили при помощи световой микроскопии на увеличении  $\times 1000$ . Подсчет клеток для составления лейкоцитарной формулы проводился методом меандра. В каждом мазке крови подсчитывали по 100 лейкоцитов. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программы STATISTICA 6.

### Результаты исследования и их обсуждение

Через 6 суток с момента заражения *Opistorchis felineus* (опытная группа) было отмечено общее изменение показателей лейкоцитарной формулы по сравнению с контрольной группой. Для сравнения показателей контрольной группы выбраны данные по В. Н. Никитину для кроликов именно в возрасте 6 месяцев [5]. Количество сегментоядерных псевдоэозинофилов контрольной группы соответствует данным литературы для кроликов в возрасте 6 месяцев, незначительно ее превышая. В опытной группе их количество больше в 1,68 раза по сравнению с контрольной группой (таблица 1).

Таблица 1

Изменения показателей лейкоцитарной формулы периферической крови кроликов в разные сроки после заражения *Opistorchis felineus*

Показатель лейкоцитарной формулы	Число клеток в условных полях зрения, среднее, %				Статистики критерия (H; cc; p)
	Контрольная группа	Опытная группа			
		6 суток	27 суток	33 суток	
Количество сегментоядерных псевдоэозинофилов	19,3	32,5	30,6	23,5	$\chi^2 = 6,66$ cc = 3 p = 0,0833
Количество палочкоядерных псевдоэозинофилов	1,6	3,5	3	3,5	$\chi^2 = 3,42$ cc = 3 p = 0,3301
Количество юных псевдоэозинофилов	0	0,6	1,7	0,8	$\chi^2 = 3,83$ cc = 3 p = 0,2802
Количество эозинофилов	1	1	1,7	1,2	$\chi^2 = 0,53$ cc = 3 p = 0,9115
Количество базофилов	1	3,5	6,7	5,5	$\chi^2 = 7,21$ cc = 3 p = 0,0653
Количество лимфоцитов	75,3	54,4	52,8	62,3	$\chi^2 = 9,33$ cc = 3 p = 0,0252
Количество моноцитов	1,7	5	5,7	3,1	$\chi^2 = 6,17$ cc = 3

					p = 0,1
Соотношение лимфоцитов псевдоэозинофилам	к	3,6	1,51	1,57	2,3
					$\chi^2 = 9,33$ сс = 3 p = 0,02

Примечание: оценка достоверности различий (p) проводилась по критерию Краскела-Уоллиса (H); различия достоверны при  $p \leq 0,05$

Количество палочкоядерных псевдоэозинофилов в контрольной группе соответствует норме. Количество палочкоядерных псевдоэозинофилов в опытной группе через 6 суток в два раза больше чем в контрольной группе. Высокое количество псевдоэозинофилов, как сегментоядерных, так и палочкоядерных, вероятно, характеризует происходящие воспалительные процессы в острой стадии инвазии. Обнаружены юные псевдоэозинофилы среди лейкоцитов опытной группы в небольшом количестве, тогда как в норме они отсутствуют. В мазках контрольной группы при подсчете лейкоцитарной формулы юных клеток не встречалось. Лейкоцитарная формула в опытной группе даже на раннем сроке имеет сдвиг влево. Такие изменения, по нашему мнению, могут быть связаны с резким раздражением гемопоэтической способности красного костного мозга, который компенсаторно реагирует на инвазию, а также с характером воспалительной реакции. В связи с развитием острой реакции на внедрение паразита организм первоначально тратит основной пул лейкоцитов, а затем пытается в короткие сроки восстановить его. Относительно большое количество палочкоядерных форм свидетельствует об уклоне воспалительного процесса в сторону хронического. Количество эозинофилов в опытной и контрольной группе через 6 суток одинаковое и соответствует норме. Это является необычным на наш взгляд явлением, ведь большинство литературных источников говорят об эозинофилии при паразитарной инвазии. Повышение количества эозинофилов в периферической крови наблюдается при аскаридозе у человека, эхиноуриозе гусей [7]. Тогда, вероятно, наличие эозинофилии зависит от вида паразита и видовой принадлежности хозяина и соответственно возможности развития типовой реакции организма. В случае атипичной модели паразитарной инвазии данный показатель незначим. Через 6 суток количество базофилов в контрольной группе соответствует показателям нормы. В опытной группе базофилов в 3,5 раза больше по сравнению с контролем. Такое большое количество базофилов вероятно связано с неспецифичностью паразита для данного вида животных и развитием ярком выраженной аллергической реакции. Это также подтверждалось клиническими признаками у животных. Количество лимфоцитов у кроликов контрольной группы соответствует норме. У кроликов опытной группы через 6 суток после заражения отмечается резкое снижение количества лимфоцитов. По сравнению с контролем этот показатель ниже в 1,3 раза. Снижение показателя связано не с истинной лимфоцитопенией а со сдвигом процентного соотношения лимфоцитов влево, и возрастанием

количества псевдоэозинофилов. Снижение лимфоцитов как показателя можно трактовать как некоторое снижение иммунной реакции. Количество моноцитов в опытной группе соответствует норме, хотя несколько ниже ее показателя. В опытной группе количество моноцитов больше в 2,9 раза по сравнению с контролем. Известно, что моноциты крови некоторое время циркулируют в периферической крови, а затем уходят в ткани. Вероятно, возрастание количества моноцитов связано с иммунными механизмами, которыми играет паразит. Большое количество моноцитов также характеризует протекание воспаления в организме опытных животных через 6 суток. Соотношение количества лимфоцитов и псевдоэозинофилов крови в контрольной группе несколько ниже, но приближено к норме. В опытной группе по сравнению с контролем это соотношение в два раза ниже. Таким образом, через 6 суток после заражения количество лимфоцитов падает, а общее количество псевдоэозинофилов возрастает.

Таким образом, через 6 суток у кроликов контрольной группы по результатам исследования лейкоцитарной формулы отмечены признаки острой воспалительно-аллергической реакции с признаками начальной компенсации, и снижение клеточного иммунитета.

Через 27 суток после заражения количество сегментоядерных псевдоэозинофилов незначительно уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком. Однако, количество сегментоядерных клеток продолжает оставаться в опытной группе в 1,5 раза больше по сравнению с контролем. Количество палочкоядерных форм также незначительно снижается в динамике, однако количество палочкоядерных псевдоэозинофилов остается почти в 2 раза больше контрольного показателя. Количество юных псевдоэозинофилов возрастает в 3 раза в сравнении с ранним сроком наблюдения. В норме и в контроле эти клетки отсутствуют. Можно заключить, что воспалительный процесс острый, что подтверждается высоким количеством сегментоядерных псевдоэозинофилов, однако, имеет тенденцию к хронизации, так как количество палочкоядерных и юных клеток нарастает. Все же на этом сроке можно говорить о стремлении организма компенсировать клеточные потери за счет увеличения юных форм клеток. Количество эозинофилов через 27 суток выросло в 1,7 раза по сравнению со сроком через 6 суток после заражения животных. Все же по сравнению с контрольной группой их число возросло несущественно – всего в 0,7 раза. Количество базофилов выросло в 2 раза по сравнению с предыдущим сроком. По сравнению с контролем их количество больше в 6,7 раз. Большое количество базофилов подтверждает воспалительно-аллергическую реакцию организма на внедрение паразита. Количество лимфоцитов через 27 суток незначительно снизилось по сравнению со сроком через 6 суток. По сравнению с контролем количество лимфоцитов снизилось в 1,4 раза. Соотношение общего количества лимфоцитов к общему

количеству псевдоэозинофилов аналогично предыдущему сроку. Соотношение лимфоцитов к псевдоэозинофилов в опытной группе через 27 суток меньше контрольного показателя в 2,3 раза. Количество моноцитов крови незначительно возросло через 27 суток, но по сравнению с контролем остается в 3,3 раза больше.

Через 33 дня с момента заражения количество сегментоядерных псевдоэозинофилов уменьшается по сравнению со сроком через 27 суток в 0,7 раза. Значение показателя опытной группы больше в 1,2 раза чем в контрольной группе. Однако уже можно отметить тенденцию к снижению количества псевдоэозинофилов, что следует расценить как становление системы «паразит-хозяин» [5] и прохождение острой фазы воспалительно-аллергической реакции. Количество палочкоядерных псевдоэозинофилов возросло по сравнению со сроком через 27 суток в 1,2 раза. Данное изменение показателя лейкоцитарной формулы говорит о хронизации воспалительного процесса. По сравнению с контролем количество палочкоядерных псевдоэозинофилов остается больше в 2,1 раза. Количество юных псевдоэозинофилов по сравнению с предыдущим сроком снизилось в 0,5 раза. Количество эозинофилов снизилось в 0,7 раз по сравнению с предыдущим сроком. По сравнению с контролем этот показатель больше незначительно, и соответствует норме, указанной в литературе. Количество базофилов уменьшается по сравнению со сроком через 27 суток в 0,8 раза. Но по сравнению с контролем количество базофилов остается больше в 5,5 раза. Количество лимфоцитов возрастает в сравнении с предыдущим сроком в 1,2 раза, однако остается ниже показателя контрольной группы в 0,8 раза. Количество моноцитов снижается в 0,5 раза по сравнению с предыдущим сроком. Количество моноцитов крови больше показателей контрольной группы в 1,8 раз. Соотношение лимфоцитов к псевдоэозинофилам по сравнению с предыдущим сроком увеличилось в 1,5 раза. По сравнению с контролем этот показатель через 33 суток остается меньше в 1,6 раз. При межгрупповом сравнении показателей лейкоцитарной формулы (по методу  $\chi^2$ ) обнаружено, что различия статистически достоверны и значимы для показателя количества лимфоцитов, соотношения лимфоцитов к псевдоэозинофилам, а по количеству эозинофилов – не значимы.

Таким образом, нами установлено, что эозинофилия при заражении кроликов описторхами отсутствует на раннем сроке развития описторхоза, а на поздних сроках - не выражена. Напротив, количество базофилов резко увеличено на всех сроках наблюдения, что говорит о выраженности аллергического характера воспалительных процессов у животных. Некоторые авторы подтверждают базофилию при инвазиях [1]. Количество сегментоядерных псевдоэозинофилов и через 6 и через 27 суток высокое, а через 33 дня начинает снижаться. Напротив, количество палочкоядерных псевдоэозинофилов возрастает с увеличением срока наблюдения. Юные псевдоэозинофилы встречали на всех сроках наблюдения. Наиболее

выраженный сдвиг лейкоцитарной формулы отмечался через 27 суток с момента заражения. К 33 суткам основные показатели лейкоцитарной формулы снижались, стремясь к показателям нормы.

### **Выводы**

Клеточный состав при подсчете лейкоцитарной формулы периферической крови кроликов при экспериментальном описторхозе характеризуется на ранних сроках наблюдения высоким количеством базофильных лейкоцитов, сегментоядерных и палочкоядерных псевдоэозинофилов, а эозинофилия отсутствует, что существенно отличается от данных литературы об изменениях лейкоцитарной формулы у человека и других животных. Через месяц показатели лейкоцитарной формулы все еще выше нормальных значений, однако начинают снижаться, стремясь к нормальным.

### **Список литературы**

- 1 Бажибина Е.Б., Коробов А.В, Серeda С.В., Сапрыкин В.П. Методологические основы оценки клинико-морфологических показателей крови домашних животных. – М.:ООО «Аквариум-Принт», 2007. – С. 128
2. Белозеров Е.С., Шувалова Е.П. Описторхоз. Л.: «Медицина», 1981. – 128 с.
3. Белов Г.Ф. Клиника и диагностика острой фазы описторхоза // Клиническая медицина. – 1971. – Т.49. - №10. – С. 135-139.
4. Борзунов В.М., Вереvщиков В.К., Донцов Г.И., Зверева Л.И., Кузнецов П.Л. Протозойные инвазии и гельминтозы человека. – Екатеринбург. – 2004. – 175 с.
- 5.Любин Н.А., Конова Л.Б Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у животных. – Ульяновск, 2005.
- 6.Мотузко Н.С., Никитин Ю.И., Марценюк А.П. Справочник клинико-биологических показателей животных, 2000.
7. Начева Л.В., Литягина А.В. Клеточные реакции при гельминтозах // Российский паразитологический журнал. – 2012. – №3 – С. 80-86.
8. Озерецковская Н.Н. Органная патология в острой стадии тканевых гельминтов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии E, G<sub>4</sub> и факторов индуцирующих иммунный ответ / Н.Н. Озерецковская // Медицинская паразитология. – 2000. – №3. – С.3-7.
9. Паразитарные болезни человека (протозоозы и гельминтозы) / Под ред. ак. РАМН В.П. Сергиева, ак. РАМН Ю.В. Лобзина, проф. С.С. Козлова. – Санкт-Петербург.: Фолиант, 2008.
10. John W. Harvey Atlas of veterinary gematology // W.B. SAUNDERS COMPANY. – 2001. – 227 pp.

**Рецензенты:**

Бибик О.И., д.б.н., профессор кафедры биологической, общей, бионеорганической химии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО КемГМА при МЗ РФ, г. Кемерово;

Кувшинов Д.Ю., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО КемГМА при МЗ РФ, г. Кемерово.