

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИНАМИЧЕСКОМ НАБЛЮДЕНИИ ПРИ ОСТРОМ ОПИСТОРХОЗЕ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сидельникова А.А.¹, Начева Л.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово, e-mail: alieva-alevtina@mail.ru

Проведен морфологический анализ клеточного состава периферической крови кроликов после инвазии *Opisthorchis felineus* в разные сроки. При оценке изменений лейкоцитов были учтены структурные особенности и их изменения в динамике. Основные результаты касаются нарушений в строении ядра и цитоплазмы клеток. Псевдоэозинофилы животных обнаруживали токсическую зернистость, значительную вакуолизацию цитоплазмы в ранние сроки наблюдения, сменяющуюся на единичные вакуоли и отсутствие специфической зернистости в отдельных участках цитоплазмы. Эозинофилы имели гиперсегментацию ядра. В цитоплазме базофилов с возрастанием срока наблюдения количество гранул резко сокращалось, менялась их локализация. У лимфоцитов в более поздние сроки также встречалась вакуолизация, дополнявшаяся базофильной пунктуацией цитоплазмы. С увеличением срока наблюдения обнаружено возрастание форм лимфолиза и патологических форм лейкоцитов (клетки Тюрка, клетки Ридера). Эритроциты имели изменения по типу пойкилоцитоза. Моноциты и кровяные пластинки визуально морфологических изменений не имели, хотя последние образовывали массивные конгломераты в поздних сроках наблюдения. Морфологические изменения клеток периферической крови отражают локальный воспалительный процесс в организме и аллергическую реакцию в ответ на инвазию.

Ключевые слова: острый описторхоз, морфологические изменения, форменные элементы крови, эксперимент.

THE MORPHOLOGICAL CHANGES OF PERIPHERAL BLOOD CELLS IN DYNAMIC OBSERVATION IN ACUTE OPISTHORCHIASIS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Sidelnikov A.A.¹, Nacheva L.V.¹

¹ *Kemerovo state medical University, Kemerovo, e-mail: alieva-alevtina@mail.ru*

A morphological analysis of the cellular composition of peripheral blood of rabbits after the invasion of *Opisthorchis felineus* in different terms. When changes of leucocytes was taken into account structural features and their changes in dynamics. The main results concern the irregularities in the structure of the nucleus and cytoplasm of cells. Pseudosinella animals have found toxic graininess, significant vacuolization in the early period of observations, all on isolated vacuoles and the absence of a specific grain in some parts of the cytoplasm. Eosinophils had hypersegmentation kernel. In the cytoplasm of basophils with the increase of the observation period the number of pellets dropped dramatically, changing their localization. The lymphocytes are later also met vacuolization, added punctuation basophilic cytoplasm. With increasing observation time discovered increasing forms impolite and pathological forms of white blood cells (cells Turk cells Reader). Red blood cells had changes in the type of poikilocytosis. Monocytes and platelets visual morphological changes were not, although the latter was formed by massive conglomerates in the later stages of observation. The morphological changes of peripheral blood cells reflect the local inflammatory process in the body and an allergic reaction in response to invasion.

Keywords: acute opisthorchiasis, morphological changes, the formed elements of blood, experiment.

При остром описторхозе значительная часть исследований периферической крови посвящена количественным изменениям клеточного состава (гемограмма, лейкоцитарная формула) [1; 5]. Качественные изменения форменных элементов крови при остром описторхозе не достаточно изучены. Морфологические изменения эозинофилов на интактных клетках *in vitro* при описторхозе констатируются как дегрануляция их цитоплазмы, с повышенной вакуолизацией ядра и цитоплазмы [8]. Изменения

периферической крови включают эозинофилию и имеют характер лейкоидной реакции [5]. Установлено, что при описторхозе нарушается состояние системы свертывания крови, обусловленное нарушением функций кровяных пластинок, однако изменение их структуры не дается [2]. Форме эритроцитов при описторхозе не уделяется должного внимания. В литературе отсутствуют подробные данные о морфологии всех форменных элементов при остром описторхозе *in vivo*. Модификация тинкториальных свойств форменных элементов при остром описторхозе в литературе не отмечена. Морфологические изменения периферической крови, происходящие при остром описторхозе, и их анализ в динамике ранее не описаны.

Цель: провести исследование и сравнительный анализ цитоморфологии периферической крови при остром описторхозе в разные сроки наблюдения.

Материалы и методы

Объектом исследований служили мазки периферической крови, взятые от зараженных животных. Работа проведена на 30 половозрелых беспородных кроликах-самцах. Животные однократно получили мышечную ткань рыб, зараженную метацеркариями *Opisthorchis felinus* из расчета по 50 личинок на одну особь. Материал снулой рыбы (видовая принадлежность – язь) получен с кафедры ихтиологии и гидробиологии Томского государственного университета. Выделение и контроль жизнеспособности проводили в компрессориуме под световым микроскопом ООО «Альтами», ТУ 9443-002-89017513-2009 на увеличении $\times 100$. Взятие периферической крови производили в утренние часы натощак из капилляров от краевой вены правого уха животных. При работе с животными авторы руководствовались «Правилами проведения работ и использованием экспериментальных животных». Работа одобрена Этическим комитетом ФГБОУ ВО «КемГМУ» Минздрава России. Подтверждение состоявшейся инвазии *Opisthorchis felinus* проводили анализами кала по Като и методом Parasер с обнаружением яиц паразита. Фиксацию мазков периферической крови производили по Романовскому (Азур-Эозин) «Минимед – Р» фирмы «МиниМед» (ТУ 9398-003-29508133-11) г. Брянск, окрашивание по Май-Грюнвальду красителем Эозин-метиленовый синий «Минимед – М-Г» фирмы «МиниМед» (ТУ 9398-003-29508133-11) г. Брянск. При исследовании периферической крови от каждого животного получали по 3 мазка в каждый срок (через 6, 27 суток, на 32, 39-е сутки). При выборе сроков исследования руководствовались клиническими данными протекания инвазии. При оценке морфологического строения форменных элементов крови учитывали строение цитоплазмы и ядра, их тинкториальные свойства. У лейкоцитов оценивали наличие и степень выраженности токсической зернистости (для псевдоэозинофилов), наличие вакуолизации цитоплазмы, наличие телец Князькова-Деле, форму и количество сегментов ядер, клетки

лейколиза, наличие патологических клеточных форм. У эритроцитов, кровяных пластинок – изменение формы, окраски, размеров, наличие и виды включений, не менее чем в 10 полях зрения. Цитологическое исследование лейкоцитов, не менее чем в 100 клетках, проводили в каждом препарате методом меандров.

Результаты и обсуждение. При исследовании цитоморфологии периферической крови кроликов через 6 суток после заражения *Opisthorchis felinus* были выявлены следующие изменения: в цитоплазме сегментоядерных псевдоэозинофилов обнаружили выраженную зернистость, гранулы грубые, с тенденцией к слиянию. Их размеры визуально больше, чем у животных контрольной группы. Распределение гранул по цитоплазме не равномерное. В отличие от оксифильной зернистости псевдоэозинофилов контрольной группы у клеток опытной группы окраска части гранул была азурофильной, с легкой степенью метакромазии. Данную зернистость охарактеризовали как токсическую, средней степени выраженности. Ядро псевдоэозинофилов насчитывало в среднем 3-5 сегментов, соединенных нитевидными перемычками. Цитоплазма псевдоэозинофилов имела небольшие участки, лишенные гранул. Отдельные клетки в цитоплазме содержали множественные вакуоли, что придавало им «пенистый» вид. По мнению авторов, токсическая зернистость возникает вследствие интоксикации, при инфекционных и воспалительных процессах [1]. Сочетание токсической зернистости и вакуолизации цитоплазмы нейтрофилов выделяют при асептическом воспалении [7]. Токсическая зернистость является результатом резкой стимуляции продукции клеток, из-за чего время созревания ускоряется [8]. Вероятно, структурные изменения цитоплазмы псевдоэозинофилов связаны не только с локальным воспалительным процессом, инициированным инвазией, но и с раздражением кроветворных органов как собственными продуктами распада, так и токсинами паразита. Эозинофилы крови кроликов экспериментальной группы имели 3-4 сегмента ядра, а у контрольной группы – 2-3 сегмента. Цитоплазма содержала крупные резко оксифильные гранулы. Гранулы имели просветленную зону в центре. Цитоплазма эозинофилов частично не содержала специфической зернистости. У базофилов выявлены аналогичные эозинофилам изменения цитоплазмы. Их ядра просматривались и имели слабодольчатую форму. Вероятно, отсутствие специфической зернистости в небольшом объеме у эозинофилов и базофилов связана с аллергической сенсibilизацией вследствие воздействия антигенов паразита. В цитоплазме средних лимфоцитов отмечали единичные светлые вакуоли средних и крупных размеров. Количество форм лимфолиза - теней Боткина-Гумпрехта-Клейна в этот срок было вариативно – 4-8%. Цитоплазма моноцитов содержала единичные светлые вакуоли.

Кровяные пластинки визуальных особенностей не имели. Хромомер базофильной окраски локализовался в центре, по периферии располагался светлый гиаломер. Контуры кровяных пластинок четкие, форма неправильная. Они были расположены немногочисленными группами.

Эритроциты кроликов обеих групп имели достаточно переменные размеры, микроциты и макроциты встречались среди нормоцитов. У кроликов обеих групп через 6 суток отмечали разницу в окраске эритроцитов – гипо- и гиперхромные формы чередовались с нормохромными. Установлено, что для кроликов полихромазия и анизоцитоз не является проявлением патологии [9; 10].

Среди обычных клеточных форм в этот срок в периферической крови были обнаружены не типичные клетки в количестве 10%. Они имели неправильную форму, очень крупные размеры, визуально были больше моноцитов крови в 2-3 раза. Ядро этих клеток лежало эксцентрично, имело овальную форму. Цитоплазма клеток была очень нежная, слабо базофильной окраски, содержала пылевидную базофильную зернистость. Клетки располагались в мазке группой. Вероятно, это гистиофагоциты моноцитарного типа. Но по сравнению с моноцитами структура их ядер была более грубая, резкой базофильной окраски. Выход в периферическую кровь тканевых фагоцитов является определенным парадоксом, поскольку моноциты крови уходят в ткани в норме и дифференцируются в макрофаги. Обратный процесс, возможно, является отображением специфического ответа на воздействие паразита, который для данного хозяина является нетипичным. Или же имеет место их образование из моноцитов непосредственно в крови, что также является парадоксальным. Появление гистиоцитов описано в начальном этапе воспалительных процессов в соединительной ткани [7].

Через 27 суток у животных экспериментальной группы сегментоядерные псевдоэозинофилы сохраняли токсическую зернистость. Отмечали наличие значительного количества разрушенных клеточных форм, их гранулы в виде россыпи располагались рядом с ядром. В отдельных клетках присутствовали ободки цитоплазмы без зернистости. В отличие от предыдущего срока, в цитоплазме содержались лишь единичные светлые вакуоли. Наоборот, множественную вакуолизацию цитоплазмы отмечали теперь у средних лимфоцитов. По сравнению с предыдущим сроком, теперь их цитоплазма приобрела «ячеистый» вид. У малых лимфоцитов была выявлена базофильная пунктуация цитоплазмы. Количество теней Боткина-Гумпрехта-Клейна составляло 2-6%, что меньше, чем в предыдущем сроке, в 1,5-2 раза. Базофилы, как и в раннем сроке, имели частично опустошенную цитоплазму, причем гранулы отсутствовали в основном в центре, сохраняясь по периферии клетки, вследствие чего ядро хорошо просматривалось. Форма ядра оставалась

типичной. У эозинофилов цитоплазма, как и в предыдущем сроке, была только частично лишена гранул. Количество сегментов ядра достигало уже 5-6. Среди клеток крови были обнаружены формы раздражения – клетки Тюрка или плазмоциты. Их цитоплазма имела выраженную резко базофильную окраску. Ее структура была неравномерна, нитчато-сетчатая, без зернистости. Вокруг ядра присутствовала зона просветления. Ядро правильной круглой формы характеризовалось грубой структурой, глыбки хроматина резко контрастировали с небольшими светлыми промежутками кариоплазмы. Данные плазмоциты отнесли к лимфоидному типу. В отличие от предыдущего срока, гистиофагоциты были единичны (до 2%).

В этом сроке эритроциты имели разную форму. Среди нормоцитов встречались эритроциты звездчатой формы, с многочисленными короткими выростами по всему периметру, что характеризовало их как акантоциты. Другие, наоборот, были вытянутой листовидной формы. Окраска таких эритроцитов была гипохромной, а гиперхромные чаще имели сферическую форму и меньший размер. Бледность в центре последних не прослеживалась, следовательно, они являлись микросфероцитами. Кроме того, встречали эритроциты, форма которых имела вид капли (дакриоциты). Пойкилоцитоз при описторхозе ранее не описывался. Их наличие, вероятно, связано с цитотоксическим действием паразита на красный костный мозг. По данным литературы, акантоциты встречаются при тяжелых заболеваниях печени, а сфероциты – при имплантации и аутоиммунных заболеваниях, дакриоциты – при токсическом гепатите [11]. Вероятно, их наличие отражает системные морфологические изменения в органах кроветворения и иммуногенеза, связанные с секреторной дисфункцией как клеток печени, так и красного костного мозга и специфической стимуляцией всей иммунной системы в связи с токсическим влиянием чужеродных протеинов паразита. Отмечали в небольшом количестве эритроциты в виде «монетных столбиков». Вероятно, это проявление неустойчивой агрегации эритроцитов связано с повреждением противосвертывающей системы крови. Данное предположение подтверждалось и образованием кровяными пластинками больших конгломератов. Хотя их структура и форма внешне особенностей не выявляла. Развитие гиперкоагуляционных сдвигов, стаз и агрегация эритроцитов описаны только при хронизации описторхозной инвазии [2]. В данном случае эти события имеют место при остром описторхозе.

Изменения цитоморфологии периферической крови кроликов через 32 суток после заражения включали: сегментоядерные псевдоэозинофилы имели слабоокрашенные перемычки между сегментами ядра. В цитоплазме клеток сохранялась токсическая зернистость, с более резкой азурофильной окраской. Цитоплазма базофилов была практически без специфической зернистости. В ней оставались лишь единичные гранулы,

крупных размеров и резкой базофильной окраски. Их локализацию наблюдали только по периферии, тогда как в центре клетки около ядра была пустая зона, подобная светлomu окну. Также можно предположить, что это молодые базофилы, так как у незрелых клеток гранулы сосредоточены только по периферии, но форма и структура их ядра больше свидетельствуют о произошедшей дегрануляции уже зрелых клеток. Эозинофилы сохраняли зернистость цитоплазмы, содержащую лишь небольшие участки без гранул. Количество сегментов ядра, как и в ранний срок наблюдения, составляло 3-4. Лимфоциты крови образовывали псевдоподии. Появились средние лимфоциты, в ядре которых присутствовала небольшая выемка. Цитоплазма многих лимфоцитов была резко гиперхромна. Подобное изменение окраски цитоплазмы можно оценить как появление лимфоцитов в переходной стадии раздражения. Ядра малых лимфоцитов типичны по строению. Количество теней Боткина-Гумпрехта-Клейна, как в ранний срок наблюдения, вновь возрастало. Гистиофагоциты не встречались.

Изменения морфологического строения клеточного ряда периферической крови через 39 суток после заражения были достаточно разнообразны. В цитоплазме псевдоэозинофилов выявляли наличие светлых участков без гранул по периферии – телец Князькова-Деле, а в остальной части сохранялась выраженная токсическая зернистость. Количество сегментов ядра клеток насчитывало 6-7. Другие, наоборот, имели по 2 сегмента, количество таких клеток составляло 4%. Цитоплазма таких клеток тоже включала тельца Князькова-Деле. Цитоплазма базофилов практически полностью не имела гранул, вследствие чего хорошо визуализировалось слабо сегментированное ядро. У эозинофилов количество сегментов ядра достигало 5. Как и в предыдущие сроки, в их цитоплазме зернистость отсутствовала в незначительном объеме. В лимфоцитах, как и через 6 суток, вновь выявлены единичные вакуоли, находящиеся в больших и средних формах. У малых лимфоцитов цитоплазма с одного края имела оксифильную окраску. Количество теней Боткина-Гумпрехта-Клейна в этом сроке переменнo – от 1 до 9. В этом сроке выявлены клетки Ридера. Эти лимфоциты имели двудольчатое ядро и слабобазофильную цитоплазму. Количество форм Ридера составляло 3-4 клетки на 100 встречаемых лейкоцитов. Наличие клеток Ридера в периферической крови при остром описторхозе в литературе не описано. Хотя указывается их появление как следствие преждевременного созревания и неправильности деления из-за ускорения кроветворения [3]. Асимметричность деления клеток выделяется авторами как одна из форм самоподдержания клеточной популяции гемопоэтических клеток, нарушение которой определено процессами преждевременного старения [4].

Нарушения в строении практически всех форменных элементов периферической крови, вероятно, связаны с цитотоксическим влиянием на кроветворные органы и

системными нарушениями в работе иммунной системы, имеющими в качестве этиологического фактора различные метаболические сбои и адаптационную «дисплазию» крови в ответ на описторхозную инвазию.

Выводы

При оценке морфологического анализа периферической крови после заражения *Opisthorchis felinus* во всех сроках наблюдения сегментоядерные псевдоэозинофилы имели токсическую зернистость, что характеризует локально протекающее асептическое воспаление в организме, связанное с описторхозной инвазией. Вакуолизация цитоплазмы псевдоэозинофилов, а затем средних лимфоцитов также характеризует воспалительный процесс, сдвиг метаболических процессов, извращение процессов эндоцитоза. Высокая способность клеток к разрушению свидетельствует о нарушении в структурах мембраны. Различные изменения структуры ядра сегментоядерных псевдоэозинфилов, лимфоцитов являются следствием неправильной дифференцировки этих клеток в красном костном мозге вследствие общей интоксикации продуктами клеточного распада поврежденных органов и метаболитами паразита. Наличие и нарастание форм лимфолиза характеризует нарушения иммунной системы. В отличие от эозинофилов, у базофилов отсутствие специфической зернистости, возрастающее с увеличением срока наблюдения, характеризует большее участие последних в неспецифической аллергической сенсibilизации. Наличие форм Ридера, ранее не описываемое при остром описторхозе, подтверждает повреждение печени. Увеличение размера кровяных пластинок является показателем нарушения как тромбоцитопоэза, так и системы свертывания крови вследствие инвазии. Пойкилоцитоз, ранее не описываемый при описторхозе, вероятно, связан с нарушением работы кроветворных органов.

Список литературы

1. Августинovich Д.Ф., Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Вишнинецкая Г.Б., Катохин А.В., Львова М.Н., Кашина Е.В., Бондарь Н.П., Феофанова Н.А., Мордвинов В.А. Экспериментальный описторхоз: исследование состава форменных элементов крови, гемопоэза и стартл-рефлекса у лабораторных животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – № 20 (2). – С. 155-164.
2. Зиновьева А.В. Состояние системы свертывания крови при хроническом описторхозе в условиях эндогенной и экзогенной тромбоинемии : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Челябинск, 2012. – 22 с.

3. Клетки Ридера // Большая медицинская энциклопедия. – URL: <http://bigmeden.ru/article>.
4. Колесник Н.В. Токсическая зернистость нейтрофилов. – URL: <http://biohimik.net/zernistost> (дата обращения: 2013).
5. Кузнецова В.Г., Краснова Е.И., Патурина Н.Г. Описиорхоз в клинической практике врача-инфекциониста // Лечащий врач. – 2013. – № 6. – С. 74.
6. Любин Н.А., Конова Л.Б. Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у сельскохозяйственных и лабораторных животных при патологиях. – Ульяновск : ГСХА, 2005. – 113 с.
7. Серов В.В., Пауков В.С. Воспаление. Руководство для врачей / под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М. : Медицина, 1995. – 640 с.
8. Суворова Е.В. Роль эозинофилов в иммунопатогенезе описиорхоза : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2007. – 24 с.
9. Третьякова О.С. Понятие об анемии: классификация, основные лабораторные характеристики // Дитячий Лікар. – 2012. – № 6 (19). – С. 46-51.
10. Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов / пер. с англ. под ред. проф. Эмануэля В.Л. - 5-е изд. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 375 с.