УДК 611.018:[616.36-06:616.995.122]-092.4

DOI: 10.31016/1998-8435-2020-14-1-53-58

Морфологическое и биохимическое обоснование изменений в печени при описторхозе

Алевтина Анатольевна Сидельникова

Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, 650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова 22а, e-mail: alieva-alevtina@mail.ru

Поступила в редакцию: 27.11.2019; принята в печать: 27.01.2020

Аннотация

Цель исследований: сопоставить структурные изменения в печени кроликов с биохимическими показателями при описторхозе в экспериментальных условиях.

Материалы и методы. Лабораторные исследования включали проведение биохимического анализа крови с определением количества аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) как основных маркеров воспаления и их соотношения, лактатдегидрогеназы (ЛДГ (общей)), креатинкиназы – КФК-МФ (мышечной), мочевой кислоты. Морфологические изменения печени определяли с помощью световой микроскопии и анализа макроскопической картины. Гистологические срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Ван Гизону (для выявления степени разрастания соединительной ткани).

Результаты и обсуждение. При биохимическом исследовании получили превышение показателей КФК-МВ в 1,93 раза, а ЛДГ – в 5,4 раза у зараженных животных. Количество мочевой кислоты было в пределах нормы. Показатели АСТ и АЛТ каждый по отдельности находились в пределах нормы, но соотношение подтверждало воспалительный процесс. При макроскопическом исследовании установлено фиброзирование края долей печени в виде ленты. При микроскопическом исследовании установлено секторальное поражение паренхимы печени с потерей цитоархитектоники и разрастанием соединительной ткани между дольками. Гепатоциты, лежащие на периферии долек, имели более выраженные структурные изменения по сравнению с центральными. В цитоплазме периферически расположенных гепатоцитов отмечали сегрегацию гранул гликогена цитоплазмы и набухание ядер. Таким образом, изменения в печени, происходящие при описторхозе на клеточном и тканевом уровнях, подтверждаются увеличением отдельных биохимических показателей и морфологическими изменениями печени, как одного из центральных органов биохимических процессов.

Ключевые слова: кролики, печень, описторхоз, морфологические изменения, биохимические показатели.

Для цитирования: Сидельникова А. А. Морфологическое и биохимическое обоснование изменений в печени при описторхозе // Российский паразитологический журнал. 2020. Т. 14. № 1. С. 53–58.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2020-14-1-53-58>

© Сидельникова А. А., 2020

Morphological and Biochemical Substantiation of Hepatic Changes at Opisthorchosis

Alevtina A. Sidelnikova

Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 22a Voroshilov Street, Kemerovo, 650056; e-mail: alieva-alevtina@mail.ru

Received on: 27.11.2019; accepted for printing on: 27.01.2020

Abstract

The purpose of the research is comparing structural changes in the liver of rabbits with biochemical parameters at opisthorchosis under experimental conditions.

Materials and methods. Laboratory studies included a biochemical blood test to determine the amount of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) as the main markers of inflammation and their ratio, lactate dehydrogenase (LDH (total)), creatine kinase – CPK-MF (muscle), and uric acid. Morphological changes in the liver were determined using light microscopy and analysis of a macroscopic pattern. Histological sections of the liver were stained with hematoxylin and eosin, and according to Van Gieson (to identify the degree of proliferation of connective tissue).

Results and discussion. A biochemical study obtained an excess of KFK-MV by 1.93 times, and LDH by 5.4 times in infected animals. The amount of uric acid was within normal limits. AST and ALT were within normal limits, but the ratio confirmed the inflammatory process. Macroscopic examination revealed fibrosis of the edge of the hepatic lobes in the form of a tape. Microscopic examination revealed a sectoral lesion of the liver parenchyma with loss of cytoarchitectonics and proliferation of connective tissue between the lobules. Hepatocytes lying on the periphery of the lobes had more pronounced structural changes compared to the central ones. Segregation of cytoplasmic glycogen granules and nuclear swelling were noted in the cytoplasm of peripherally located hepatocytes. Thus, changes in the liver that occur during opisthorchosis at the cellular and tissue levels are confirmed by an increase in individual biochemical parameters and morphological changes in the liver, as one of the central organs of biochemical processes.

Keywords: rabbits, liver, opisthorchosis, morphological changes, biochemical parameters.

For citation: Sidelnikova A. A. Morphological and biochemical substantiation of hepatic changes at opisthorchosis. *Rossiyskiy parazitologicheskij zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2020; 14 (1): 53–58.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2020-14-1-53-58>

Введение

Описторхоз, как паразитарное заболевание с локализованным расположением паразита в желчных протоках, является широко распространенным в настоящее время. Биохимические показатели, изменяющиеся при описторхозе, не имеют самостоятельного клинического значения, однако могут быть значимы в комплексной оценке с морфологическими изменениями.

При описторхозе у больных отмечают увеличение уровня АЛТ из-за разрушения паренхимы печени, с разрушением мембран клеток и выхода их цитоплазматических ферментов [1]. АЛТ повышен при гепатитах разного происхождения, токсического поражения и циррозов. АСТ повышается из-за повреждения цитоплазмы и митохондрий клеток печени, почек, миокарда и волокон скелетных мышц [4]. Сочетание этих ферментов характеризует активность патологических процессов, протекающих в печени [7]. Другие показатели, такие как ЛДГ, КФК, мочевая кислота при описторхозе обычно остаются без внимания. Также, при описторхозе отмечают гипербилирубинемия в 15,7% случаев [2]. В патоморфологическом исследовании при хроническом описторхозе выявляли цитолитический син-

дром в 40,3% случаев, фиброзирование в 2,6%. Известно, что при описторхозе происходит фиброз печени, сопровождаемый изменением желчевыводящих путей по типу холангита [3, 7]. При острой фазе описторхоза установлено изменение ядерно-цитоплазматического соотношения гепатоцитов, нарушение форм долек печени, макроскопически – увеличение печени в размере [5, 6].

Целью наших исследований было: сопоставление структурных изменений в печени кроликов с биохимическими показателями при описторхозе в экспериментальных условиях.

Материалы и методы

При проведении эксперимента учитывали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Работа проведена на 10 животных (кролики, самцы). Животных заражали метацеркариями *Opisthorchis felineus* (S. Rivolta, 1884 г.) перорально. Метацеркарии паразита выделяли вручную из мышечной ткани рыб (елец, р.Томь, г. Томск). Для контроля видовой принадлежности и жизнеспособности личинок использовали световую микроскопию при увеличении $\times 100$, $\times 400$, а также путем инцистирования. Зараженность кроликов подтверждали обнаружением яиц

O. felinus в фекалиях по методу Parasер более чем через 1 мес. после заражения. Через 1,5 года проводили биохимическое исследование. Для этого в утренние часы, натощак проводили катетеризацию вен передних конечностей; через канюлю получали 4 мл венозной крови. Кровь помещали в герметичные пробирки, затем отделяли плазму крови в центрифуге в течение 5 мин. со скоростью 100 об./мин. После этого плазму инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Биохимическое исследование проводили при помощи гематологического анализатора лаборатории больницы г. Кемерово. Определяли содержание лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы-МВ (КФК-МВ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), мочевины. Полученные данные обрабатывали статистически. Животных в конце эксперимента усыпляли наркозной смесью. Затем оценивали макроскопическую картину печени. Проводили аутопсию печени с фиксацией в смеси формалина – воды (1 : 10) с повторной перезаливкой через сутки. Гистологический материал готовили стандартной проводкой. Ультратонкие срезы готовили с помощью санного микротомы, окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты печени исследовали с помощью световой микроскопии при различных увеличениях, а также с помощью иммерсионной микроскопии.

Результаты и обсуждение

При изучении структур в печени обнаружено изменение нормальной структуры

органа. Отмечается наличие секторального поражения органа. Часть печеночных долек сохранила нормальное строение. Повидимому, это та часть, которая имела выраженную регенераторную активность за счет наличия камбиальных элементов, сохранности структур, и факторов, выделяемых паразитом. Другая часть долек печени теряла шестигранную призматическую форму, дольки имели округленную форму разной величины. Междольковая соединительная ткань, в норме лежащая лишь в области портальных трактов, разрасталась, окружала дольки с одной или всех сторон.

При патологоанатомическом исследовании в макроскопической картине органа отмечали сохранность центральных частей долей печени и, наоборот, лентовидное фиброзирование края долей печени, продолжительность которого составляла 7–12 см, а ширина 0,1–0,8 см. Отмечали увеличение размеров печени.

При биохимическом исследовании установлено повышение уровня фермента КФК-МВ в плазме (табл. 1). Так, при нормальном значении от 24 U/L (ед./л) показатели КФК-МВ достигали значений от 299 до 600 ед./л. При сравнении показателя КФК-МВ у зараженных описторхисами кроликов наблюдали превышение значений контрольных (незараженных) животных на 206,2 ед./л (в 1,93 раза). При межгрупповом сравнении данных U-критерий Манна-Уитни составил 10, критическое значение 23, различия уровня признака в сравниваемых группах статистически значимы ($P \leq 0,05$).

Таблица 1

Биохимические показатели крови при описторхозе

Биохимический показатель	Нормальные значения показателя, ед./л	Значение показателя для групп	
		опытной	контрольной
КФК-МВ	24–170	427,8±163,8	221,6±36,8
ЛДГ	132–252	1311,4±575	244,8±70,9
АСТ	5–40	24,2±5,54	16±3,8
АЛТ	5–40	31,2±10,37	16,8±2,77
АСТ/АЛТ	1 : 1	1 : 1,29	1 : 0,95
Мочевина	2,5–8,3	7,1±0,73	6,22±0,35

Содержание КФК-МВ повышается при поражении мышечной ткани и является специфическим индикатором. Обычно, этот фермент является внутриклеточным и отвечает за энергетический обмен клеток. Его повышение у кроликов, имеющих ограниченный режим движения и отсутствие выраженной мышечной нагрузки конечностей, позволяет судить о поражении других мышц, входящих в состав органов с повышенной физиологической нагрузкой, таких как сердце и диафрагма. Фермент попадает в кровоток, где в норме находится в незначительном количестве, вследствие повреждения мембран клеток при гипоксии и (или) ином поражении. Так, нами уже отмечалось наличие признаков гипоксических изменений в печени при описторхозе. Также известно, что рост соединительной ткани происходит аналогично в условиях снижения оксигенации тканей. Значит, перипортальный фиброз долек печени может провоцироваться гипоксией тканей, что подтверждает высокий уровень КФК-МВ. Причиной гипоксии в этом случае может являться как ангиопатия (воспалительные изменения кровеносных сосудов порталных трактов), в том числе их склерозирование из-за разрастания соединительной ткани, вследствие чего ткани не кровоснабжаются в полном объеме, так и перераспределения давления в сосудах печени из-за секторального воспалительного процесса, а также воспаление мышц диафрагмы, что приводит к поверхностному дыханию.

Формируемый окислительный стресс провоцируется перерастратой кислорода в митохондриях с выделением большого количества АТФ из-за резкой стимуляции роста новых клеток и коллагеногенеза. Сам же паразит является анаэробом и кислород не потребляет. Однако, выделяемые им факторы роста могут приводить к локальной перестройке тканей печени.

Повышение КФК-МВ может происходить из-за хилеза пробы или повышенного гемолиза. Отмечают повышение КФК-МВ при ряде инфекционных болезней, но данных по описторхозу нет. Причина этого – формирование ряда макрокомплексов, где изофермент связывается с Ig G, реже – Ig A. Подобные иммуноглобулины формируются при описторхозе, а значит повышение КФК-МВ может служить неспецифическим маркером. Наличие макрокомплексов выявляют у 14% больных циррозом печени, у 16% больных гепатокарциномой.

При исследовании гепатоцитов зараженных описторхисами кроликов отмечено, что периферически лежащие клетки имеют более выраженные изменения ядра и цитоплазмы по сравнению с центральными. Нами установлено изменение тинкториальных свойств цитоплазмы периферических гепатоцитов, проявляемое как слабая оксифилия, чередующаяся с мозаичной окраской за счет сегрегации гранул гликогена цитоплазмы. Центральные гепатоциты по сравнению с ними имели равномерную окраску цитоплазмы. У отдельных клеток отмечали стирание границ кариеолеммы, характеризующее набухание ядер. Гепатоциты, лежащие в дольке периферически, выполняют задачи синтеза всех основных белков крови и других веществ, относящихся к системе свертывания. При недостатке кислорода происходит угнетение клеточного синтеза. В данном случае происходит избирательное распределение кислорода, необходимое для самоподдерживания клеток. По сути, происходит зашлаковывание клетки оксидом углерода, что приводит к повышенному потреблению клеткой кислорода, которое не покрывает его испытываемый дефицит. Так, поражение миокарда не коронарного генеза, о чем свидетельствует высокий уровень КФК-МВ, возможно при нарастании интоксикации из-за поражения гепатоцитов, лежащих в дольке центрально. Гепатоциты, расположенные центрально, могут снижать антиоксидантную функцию из-за снижения количества и качества ферментов лизосом, продуцируемых в агранулярной эндоплазматической сети. Водно-электролитные нарушения также могут провоцировать изменения гепатоцитов дольки, что сопровождается набуханием их ядер.

Референсные значения ЛДГ в норме у человека составляют 135–225 ед./л, у кролика – 132–252 ед./л, т. е. показатели между видами можно считать примерно одинаковыми с погрешностью 3–27 ед./л. При сравнении ЛДГ у зараженных кроликов и контрольных его значение больше на 1066,6 ед./л (в 5,4 раза). При межгрупповом сравнении U-критерий Манна-Уитни равен 0, критическое значение 23, различия уровня признака в сравниваемых группах статистически значимы ($P \leq 0,05$).

ЛДГ является цинксодержащим клеточным ферментом, превращающим молочную кислоту в пируват в клетках поперечнополосатой соматической и сердечной мышечной

ткани, в клетках печени и почек, а также эритроцитах. Высокий уровень ЛДГ регистрируют при значительном разрушении тканей и клеток; это маркер клеточной деструкции. Клинико-диагностическое значение высокого уровня ЛДГ отмечают при гепатите, гемолизе эритроцитов.

При изучении нами мазков периферической крови отмечали повреждение эритроцитов, сладж-симптом и пойкилоцитоз при остром описторхозе. Это подтверждает появление нарушений в противосвертывающей системе крови. Гемолиз эритроцитов при описторхозе может происходить в клетках ретикулоэндотелиальной системы, таких как макрофаги селезенки, красного костного мозга и клетках Купфера. При исследовании гистоархитектоники печени было обнаружено увеличение размеров клеток Купфера, которые выполняют фагоцитоз нагруженных антигенами эритроцитов. Также, в печени при описторхозе отмечается поражение значительного числа гепатоцитов, расположенных вблизи зоны инвазии, что и может отражаться в повышенном уровне ЛДГ. Однако, увеличения размеров селезенки при макроскопическом исследовании нами не установлено. Значительные отклонения в содержании ЛДГ подтверждают наблюдаемые морфологически признаки окислительного стресса, происходящего в гепатоцитах при описторхозе, формированием грануляционной ткани в области порталных трактов.

Ферменты АСТ и АЛТ служат в качестве маркеров воспалительных процессов в печени; при повышении их количества у больных отмечается цитолитический синдром. Так, при описторхозе [3] у больных в острой фазе выявлено повышение активности этих ферментов в диапазоне от 2 до 7 раз в сравнении с нормой. Хроническая фаза, сопровождаемая желтухой, у многих больных сопровождается повышенным содержанием АЛТ.

При исследовании зараженных описторхисами кроликов на содержание данных ферментов в плазме крови установлено, что их значения находятся в пределах нормы. Однако, по сравнению с группой контроля по показателю АСТ отмечается превышение на 8,2 ед./л (в 1,5 раза больше). У-критерий Манна-Уитни при межгрупповом сравнении равен 12, критическое значение 23, различия уровня

признака в сравниваемых группах статистически значимы ($P \leq 0,05$).

Значение АЛТ у зараженных кроликов по сравнению с группой контроля превышает на 14,4 ед./л (в 1,85 раза больше). У-критерий Манна-Уитни при межгрупповом сравнении равен 10, критическое значение 23, различия уровня признака в сравниваемых группах статистически значимы ($P \leq 0,05$).

При соотнесении показателей было отмечено, что у зараженных кроликов значение соответствует норме с небольшой погрешностью в 0,05 ед./л. В опытной группе соотношение АСТ/АЛТ отличается от нормальных значений в сторону увеличения нижнего показателя на 0,3 ед./л. Такое изменение характеризует воспалительный процесс в печени. При описторхозе, как в острой, так и в хронической фазе, у больных людей наблюдают повышение содержания АЛТ, что связывают с повреждением мембран значительного числа клеток, ферменты которых и попадают в кровоток [7]. Показатель АЛТ с таким значением соответствует нижней границе диапазона значений при механической желтухе (30–150 ед./л) и почти – инфаркта миокарда (34–150 ед./л). В нашем эксперименте фермент повышен по сравнению с контролем, однако укладывается в диапазон нормальных значений, что, по-нашему мнению, можно связать с частичной компенсацией воспалительного процесса, вероятно за счет выделения паразитом пролиферативных факторов роста, необходимых для создания микросреды в окружающих паразита тканях, а также стимуляции репарации в тканях, способных к пролиферации.

Содержание мочевины в плазме крови зараженных кроликов соответствует значениям нормы, однако по сравнению с группой контроля больше на 0,88 (в 1,14 раз). У-критерий Манна-Уитни при межгрупповом сравнении равен 10, критическое значение 23, различия уровня признака в сравниваемых группах статистически значимы ($P \leq 0,05$). Содержание мочевины в плазме крови повышается в случае нарушения пуринового обмена. Тем не менее, при описторхозе нарушения по данному показателю не было или оно было латентно и на момент исследования не проявлялось. Так, избыток мочевой кислоты может откладываться в тканях в виде солей, не обнаруживаясь в циркулирующей крови.

Таким образом, при биохимическом исследовании установлено, что при описторхозе в отдаленный период с момента заражения содержание мочевины, АСТ, АЛТ находятся в диапазоне нормальных значений. Лишь при учете соотношения АСТ/АЛТ выявлены признаки протекающего воспалительного процесса. В то же время, содержание КФК-МВ и ЛДГ достигают практически критических значений. Высокие значения данных показателей, кроме того, могут быть связаны с тем, что исследование проводилось в зимний период, что отражается на диете животных (сухой корм, малое потребление жидкости). В то же время, неоспоримо изменения всех показателей связаны с полиорганной недостаточностью, которая сопровождает течение описторхозной инвазии. Поражение одного из важнейших в детоксикации организма органа – печени проявляется на клеточном уровне и тканевом в виде локальной пролиферации междольковой соединительной ткани, фиброзировании края органа, нарушения гистоархитектоники классических печеночных долек.

Литература

1. Какорин С. В., Былова Н. А. Клинический случай высокого уровня креатинфосфокиназы // Архив внутренней медицины. 2015. № 2(22). С. 62–64.
2. Карбышева Н. В., Бобровский Е. А., Салдан И. П., Волчкова Е. В., Никонорова М. А., Немилостива Е. А. Манифестация патологии печени при хроническом описторхозе, вопросы диагностики и профилактики // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2018. № 1. С. 40–43.
3. Кузнецова В. Г., Краснова Е. И., Патурина Н. Г. Описторхоз в клинической практике врача-инфекциониста // Лечащий врач. 2013. № 6. С. 74–78.
4. Руженцева Т. А., Милейкова Е. И., Моженкова А. В., Новоженова Ю. В., Кобызева О. М., Дубравитский В. А., Гребец Л. Л., Мешкова Н. А. Значение повышения МВ-креатинкиназы при различной экстракардиальной патологии // Лечащий врач. 2018. № 10. С. 80–83.
5. Сидельникова А. А., Начева Л. В. Новые аспекты гистоархитектоники печени в ранние сроки индуцированного описторхоза // Здоровье и образование в 21 веке. 2017. Т. 19, № 10. С. 321–323.
6. Сидельникова А. А., Начева Л. В. Гистологические особенности гепатоцитов при остром индуцированном описторхозе // Матер. XIII Междунар. заоч. науч.-практ. конф. «Наука в современном информационном обществе». 2017. Т. 3. С. 6–8.
7. Фролова О. В., Старцева О. Н. Сравнительная характеристика биохимических показателей крови у больных острым и хроническим описторхозом // Фундаментальные исследования. 2004. № 3. С. 121–122.

References

1. Kakorin S.V., Bylova N. A. A clinical case of a high level of creatine phosphokinase. *Arkhiv Vnutrennei Meditsiny = Archive of Internal Medicine*. 2015; 2 (22): 62–64. (In Russ.)
2. Karbysheva N. V., Bobrovsky E. A., Saldan I. P., Volchkova E. V., Nikonorova M. A., Nemilostiva E. A. Manifestation of liver pathology in chronic opisthorchosis, issues of diagnosis and prevention. *Epidemiologiia i Infektsionnye Bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*. 2018; 1: 40–43. (In Russ.)
3. Kuznetsova V. G., Krasnova E. I., Paturina N. G. Opisthorchosis in the clinical practice of an infectious disease doctor. *Lechashchii Vrach = Treating Doctor*. 2013; 6: 74–78. (In Russ.)
4. Ruzhentseva T. A., Mileykova E. I., Mozhenkova A. V., Novozhenova Yu. V., Kobyzeva O. M., Dubravitsky V. A., Grebets L. L., Meshkova N. A. The meaning of elevated creatine kinase-MB in various extracardiac pathology. *Lechashchii Vrach = Treating Doctor*. 2018; 10: 80–83. (In Russ.)
5. Sidelnikova A. A., Nacheva L. V. New aspects of liver histoarchitectonics in the early stages of induced opisthorchosis. *Zdorove i Obrazovanie V 21 Veke = Health and Education in the 21st Century*. 2017; 19 (10): 321–323. (In Russ.)
6. Sidelnikova A. A., Nacheva L. V. Histological features of hepatocytes in acute induced opisthorchosis. Proceedings of the XIII International Extramural Scientific and Practical Conference “Science in the modern information society.” 2017; 3: 6–8. (In Russ.)
7. Frolova O. V., Startseva O. N. Comparative characteristics of blood biochemical parameters in patients with acute and chronic opisthorchosis. *Fundamentalnye Issledovaniya = Fundamental Research*. 2004; 3: 121–122. (In Russ.)