

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-2-28-33

FASCIOLA HEPATICA: MORFOMETРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯИЦ ФАСЦИОЛ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ТРИКЛАБЕНДАЗОЛА

БИБИК О.И., ШТЕРНИС Т.А., НАЧЕВА Л.В.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

ORIGINAL ARTICLE

FASCIOLA HEPATICA: MORPHOMETRIC ANALYSIS OF EGGS AFTER TRICLABENDAZOLE TREATMENT

OKSANA I. BIBIK, TATIANA A. SHTERNIS, LYUBOV V. NACHEVA

Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056), Russian Federation

Резюме

Цель. Оценить эффективность триклабендазола на яйцепродукцию *Fasciola hepatica* с использованием метода морфометрического анализа яиц гельминта.

Материалы и методы. Объектом исследования служили трематоды вида *Fasciola hepatica*, взятые из печени спонтанно инвазированных овец после действия триклабендазола в дозе 10 мг/кг на организм хозяина. Животные контрольной группы антигельминтика не получали. Для оценки эффективности воздействия антигельминтика использовали морфометрический анализ яиц трематод, включающий оценку общих размеров яиц трематод ($n = 50$) в норме и после воздействия препарата.

Результаты. Статистический анализ яиц фасциол после действия Триклабендазола показал объективные их изменения в сторону увеличения общих размеров яиц $9,15 \cdot 10^{-8} \pm 0,06$

мм³ ($p=0,002$) и их содержимого $6,98 \cdot 10^{-8} \pm 0,04$ мм³ ($p=0,0001$) по отношению к норме соответственно $8,11 \cdot 10^{-8} \pm 0,71$ и $5,3 \cdot 10^{-8} \pm 0,12$ мм³. Изменение размеров содержимого яиц по сравнению с нормой свидетельствует о проницаемости скорлуповой оболочки и набухании содержимого яиц. Соотношение между общими размерами яиц и размерами их содержимого увеличивается 1:0,77 когда в норме составляет 1:0,65 ($p=0,0001$), что указывает на патологические процессы яиц в матке, вызванные Триклабендазолом, а именно, дегенерацию яиц и прекращение их дальнейшего развития.

Заключение. Триклабендазол в дозе 10 мг/кг действующего вещества на организм хозяина влияет на яйцепродукцию фасциол, изменяя их морфометрию.

Ключевые слова: *Fasciola hepatica*, антигельминтика, триклабендазол, яйца фасциол, содержимое яиц, морфометрия, патология.

English ►

Abstract

Aim. To evaluate effects of triclabendazole on the egg production by *Fasciola hepatica*.

Materials and Methods. *Fasciola hepatica* were isolated from the liver of spontaneously invaded sheep after the administration of triclabendazole (10 mg/kg). Control animals did not receive anthelmintics. Efficacy of triclabendazole was assessed using the morphometric analysis of the eggs ($n = 50$).

Results. Administration of triclabendazole led to the increase in total egg size as compared to control animals ($9.15 \cdot 10^{-8} \pm 0,06$ mm³ and $8,1 \cdot 10^{-8} \pm 0,71$ mm³, respectively, $p = 0,002$) and their content ($6.98 \cdot 10^{-8} \pm 0,04$ mm³ and $5,3 \cdot 10^{-8} \pm 0,12$ mm³, respectively, $p = 0,0001$) suggestive of increased permeability of the shell and swelling of the eggs. Total size of eggs to size of their contents was 1:0,77 compared to 1:0,65 in control animals ($p = 0,0001$) that indicated egg degeneration.

Conclusion. Triclabendazole at a dose of 10 mg/kg causes degeneration of *Fasciola hepatics* eggs and leads to cessation of their development.

Keywords: *Fasciola hepatica*, anthelmintics, triclabendazole, eggs, contents of eggs, morphometry, pathology.

Введение

Высокая регистрация фасциолёза у животных на территории России позволяет прогнозировать и увеличение заболеваемости человека этим гельминтозом [1-4]. Выявлены случаи инвазии фасциолами людей и в Кемеровской области, а значит, фасциолёз человека является актуальной проблемой здравоохранения [5] в этом регионе.

Триклабендазол – препарат, эффективность которого против взрослых и молодых фасциол при лечении спонтанно инвазированных животных в естественных условиях показана большим количеством исследований [6, 7]. Препарат триклабендазол, в химическом строении 5-хлор-6-(2,3-дихлорфенокси)-2-метилтиобензимидазол, был открыт и введен, прежде всего, в ветеринарную практику фирмой Сиба-Гейги (Швейцария) в 1983 году (рисунки 1). После экспертной оценки антигельминтика ВОЗ было принято решение об использовании триклабендазола для лечения фасциолёза людей в терапевтической дозе препарата 10 мг/кг, которое оказалось эффективным [5].

Многочисленные морфофункциональные исследования органов и тканей как фасциол, так и других трематод до и после действия препарата в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*, проведённые нами с помощью гистологических и гистохимических методов [8, 9], наглядно показали, что микроморфофункциональное изучение дополняет копрологические данные по эффективности действия антигельминтиков и одновременно позволяют установить механизм их действия на каждую ткань и каждый орган сосальщиков [10, 11]. Патоморфологические методы исследования дают возможность изучить действие лекарственного вещества одновременно на большом числе сосальщиков, что увеличивает статистическую мощность исследования действия препарата на фасциол и повышает эффективность данных исследований [12]. Методы статистического анализа дополняют, подтверждают данные микроморфологических исследований и дают возможность объективно оценить полученные в эксперименте результаты [7].

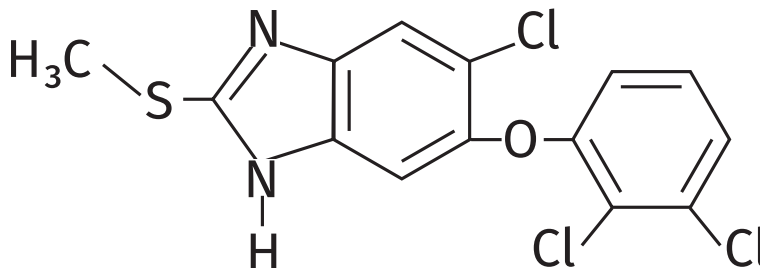


Рисунок 1. Химическая формула триклабендазола [5-хлор-6-(2,3-дихлорфенокси)-2-метилтиобензимидазол]

Figure 1. Chemical formula of triclabendazole [5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methylthio-1H-benzimidazole]

Морфометрический анализ яиц для выявления трематодоцидной эффективности антигельминтных средств позволяет выявить микроскопические изменения размеров как самих яиц, так и их содержимого, а также соотношение общих размеров яиц к их содержимому, что наглядно подтверждает действие антигельминтика на формирование и дальнейшее развитие гельминта [13].

Цель исследования

Оценить эффективность триклабендазола на яйцепродукцию *Fasciola hepatica* с использованием метода морфометрического анализа яиц гельминта.

Материалы и методы

Объектом исследования служили трематоды вида *Fasciola hepatica*, взятые из печени спонтанно инвазированных овец после действия триклабендазола в дозе 10 мг/кг на организм хозяина. Животные контрольной группы антигельминтика не получали. Паразитов фиксировали в растворе метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1, а затем в 70% этиловом спирте.

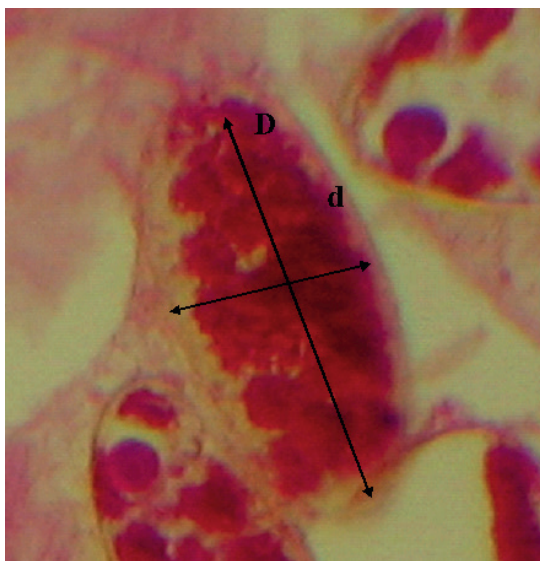
Материал обрабатывали по общепринятой гистологической методике и заливали в парафин. Срезы готовили из половозрелых трематод *Fasciola hepatica* толщиной 5-7 мкм, окрашивали. Измерения яиц трематод проводили на гистологических препаратах в световом микроскопе «Микмед-6», используя окуляр-микрометр ШИО-8*. Экспериментальный материал для исследований был предоставлен заведующим лабораторией экспериментальной терапии животных ФГБНУ ВНИИП им. К.И. Скрябина профессором И.А. Архиповым, за что авторы выражают благодарность.

Рисунок 2.

Яйцо *Fasciola hepatica* без лечения. Микрофото. Ув. x100. Окраска гематоксилин-эозином. D – большой диаметр яйца; d – малый диаметр яйца

Figure 2.

Egg of *Fasciola hepatica* without administration of triclabendazole, D is the large diameter, d is the small diameter, hematoxylin and eosin staining, x100



Для оценки эффективности воздействия антигельминтика использовали морфометрический анализ яиц трематод. Метод морфометрии со статистическим анализом включал следующие этапы:

1. На гистологических препаратах из *Fasciola hepatica* измеряли в миллиметрах с помощью окуляр-микрометра в световом микроскопе общие размеры 50 яиц трематод и размеры их содержимого по большому и малому диаметрам в норме и после воздействия препарата, находящихся в дистальном отделе матки, – зрелые яйца с несформированными мирацидиями (**рисунок 2**).

2. Рассчитывали объемы яиц (V) и их содержимого с применением формулы объема эллипсоида

$$\frac{\pi}{6} \cdot D \cdot d^2 [7],$$

где D – большой диаметр, d – малый диаметр.

3. Статистическую обработку материала проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics Base Campus Edition (Лицензионный договор №20170918-1). Статистическая обработка материала включала изучение характера распределения количественных признаков методом Шапиро-Уилка, расчет средних величин и их ошибок. Оценку уровня статистической значимости различий между размерами яиц до и после воздействия препаратов осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. В качестве уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимался $p=0,05$.

Результаты и обсуждение

Микроморфологические исследования гистологических микропрепаратов из *Fasciola hepatica* показали, что яйца, находящиеся в матке трематод, имели разные стадии развития. В начальных отделах матки происходит дробление оплодотворенной яйцеклетки и первые стадии структуризации скорлуповой оболочки яиц. В средних отделах матки яйца имеют развивающийся зародыш, а также не до конца оформленную яйцевую оболочку. В концевых отделах матки яйца имеют плотную скорлуповую оболочку желтого цвета и содержат несформированный, но уже готовый к развитию в окружающей среде зародыш. Яйца на каждой стадии развития разного размера. Отличаются они между собой и внутренним содержимым. В норме, до действия антигельминтика, композиция содержимого в процессе формирования яиц меняется. Любое отклонение от устоявшихся морфофункциональных канонов формирования яиц представляет патологию, блокирующую полноценное развитие яиц фасциол. Это наглядно обнаруживается после действия антигельминтика и доказывается при применении морфометрических методов исследования яиц.

На основании собственных исследований патоморфологии яиц *Fasciola hepatica*, взятых после действия антигельминтика триклабендазола, установлены параметры морфофункциональных изменений (отклонений от нормы). Они выражены разрушением яиц – частичным или полным, изменением их количественного и качественного образования, а также выделением во внешнюю среду. Визуально наблюдалась сохранность яиц, а при углубленном микроскопическом исследовании выявлялось четкое нарушение их общих размеров и размеров содержимого. Поэтому внешняя сохранность тела гельминта и его яиц – это еще не свидетельство жизнеспособности и полноценности дальнейшего их развития. Следует проводить микроморфологическое изучение, разрабатывая патоморфологический контроль действия антигельминтиков. Требуется морфометрический анализ структур со статистической обработкой.

Впервые проведенные нами морфометрические замеры размеров яиц *Fasciola hepatica* и их содержимого до и после действия препарата триклабендазола со статистическим анализом показателей объективно подтверждают ранее установленные гистологические данные об микроморфофункциональных изменениях яиц

№	Параметры <i>Parameters</i>	До воздействия антигельминтика (норма) <i>Control animals</i>	После действия Триклабендазола <i>Triclabendazole treatment</i>	
		M±m	M±m	p
1	Большой диаметр яйца, мм <i>Large diameter of the egg, mm</i>	$(0,00858 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	$(0,00862 \pm 0,02) \cdot 10^{-5}$	0,0006
2	Малый диаметр яйца, мм <i>Small diameter of the egg, mm</i>	$(0,00432 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$	$(0,00451 \pm 0,01) \cdot 10^{-5}$	0,0003
3	Большой диаметр содержимого яйца, мм <i>Large diameter of the egg content, mm</i>	$(0,00744 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	$(0,00767 \pm 0,02) \cdot 10^{-5}$	0,0001
4	Малый диаметр содержимого яйца, мм <i>Small diameter of the egg content, mm</i>	$(0,0038 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(0,0042 \pm 0,01) \cdot 10^{-5}$	0,0001
5	Общий объем яйца, мм ³ <i>Egg volume, mm³</i>	$(8,11 \pm 0,71) \cdot 10^{-8}$	$(9,15 \pm 0,06) \cdot 10^{-8}$	0,002
6	Объем содержимого яйца, мм ³ <i>Volume of egg content, mm³</i>	$(5,3 \pm 0,12) \cdot 10^{-8}$	$(6,98 \pm 0,04) \cdot 10^{-8}$	0,0001
7	Соотношение общего объема яйца к его содержимому, мм ³ <i>Volume of egg to volume of its content, mm³</i>	$(0,65 \pm 0,002) \cdot 10^{-8}$	$(0,77 \pm 0,004) \cdot 10^{-8}$	0,0001

M – средняя величина объема; m – ошибка средней; p – достигнутый уровень статистической значимости.

M is for mean volume, m is for standard error, p is for standard deviation

Таблица 1. Морфометрические данные и статистический анализ морфометрических исследований размеров яиц, находящихся на стадии развития в дистальных отделах матки фасциол в норме и после действия антигельминтика триклабендазола

Table 1. Morphometric data of *Fasciola hepatica* eggs in control and triclabendazole-treated sheep

и их содержимого, вызываемых триклабендазолом у фасциол [10]. Результаты исследования действия препарата триклабендазола на *Fasciola hepatica in vivo* демонстрируют увеличение общих размеров яиц фасциол $9,15 \cdot 10^{-8} \pm 0,06$ мм³ (p = 0,002) и их содержимого $6,98 \cdot 10^{-8} \pm 0,04$ мм³ (p = 0,0001) по отношению к норме соответственно $8,11 \cdot 10^{-8} \pm 0,71$ и $5,3 \cdot 10^{-8} \pm 0,12$ мм³ (таблица 1).

Изменение размеров содержимого яиц по сравнению с нормой свидетельствует о проницаемости скорлуповой оболочки и набухании содержимого яиц. Соотношение между общим объемом яиц к их содержимому увеличивается 1:0,77 когда в норме составляет 1:0,65 (p= 0,0001), что указывает на патологические процессы в матке, вызванные триклабендазолом, а именно дегенерацию яиц, развития которых не происходит. Морфометрические показатели подтверждают ранее установленные микроморфологические изменения яиц фасциол после действия антигельминтика триклабендазола тем, что в конечных отделах матки сформированные яйца имели деформированную оболочку, а содержимое яиц было дезорганизовано [10]. Яйцевая оболочка теряла тинкториальные свойства, прокрашиваясь базофильным красителем (рисунок 3, 4).

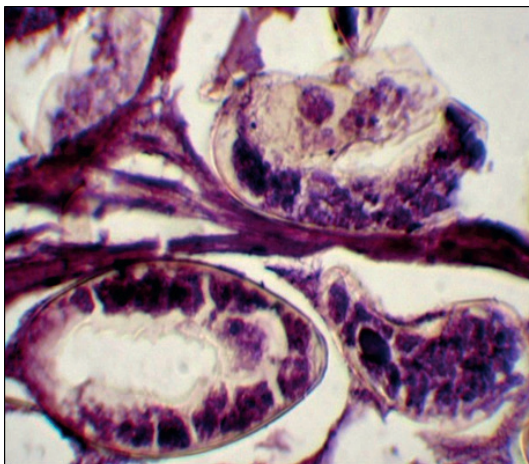


Рисунок 3. Яйца *Fasciola hepatica* после действия триклабендазола. Микрофото. Ув. X280. Окраска гематоксилин-эозином.

Figure 3. Eggs of *Fasciola hepatica* after administration of Triclabendazole, hematoxylin and eosin staining, x280.

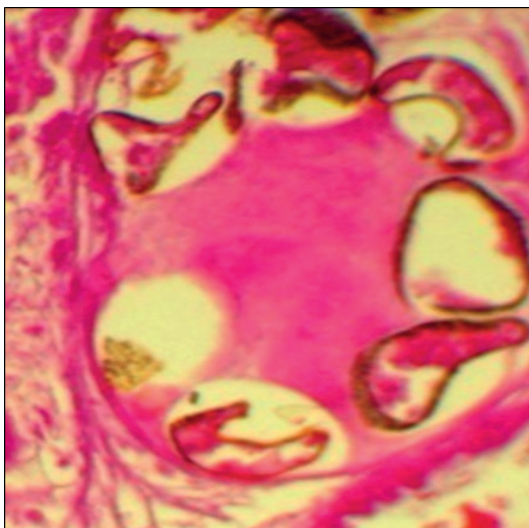


Рисунок 4. Фрагмент матки *Fasciola hepatica* после действия триклабендазола. Микрофото. Ув. X56. Окраска по Маллори.

Figure 4. Fragment of *Fasciola hepatica* uterus after administration of Triclabendazole, Mallory's trichrome staining, x56.

Заключение

Установлено, что морфометрические показатели яиц *Fasciola hepatica* в процессе их развития в матке гельминта дают возможность получить дополнительную информацию о действии антигельминтика и позволяют максимально объективизировать патологию, вызванную препаратом. Морфометриче-

ский анализ размеров яиц и их содержимого подтвердил данные патоморфологических и гистохимических исследований о токсическом действии Триклабендазола и микроморфофункциональных изменениях яиц *Fasciola hepatica* ($p = 0,0001$). Триклабендазол блокирует формирование яиц фасциол, вызывая стерилизацию инвазионного материала.

Литература / References:

- Gorohov VV, Samoylovskaya NA, Peshkov RA. Forecast of epizootic situation on main helminthosis in Russian Federation for the year 2014. Russian Journal of Parasitology. 2014; (2): 32-33. Russian (Горохов В.В., Самойловская Н.А., Пешков Р.А. Прогноз эпизоотической ситуации в РФ по основным гельминтозам на 2014 год // Рос. паразитологический журн. 2014. № 2. С. 32-33).
- Musayev MB, Milenina MV, Arkhipov IA, Khalikov SS, Mikhaylitsyn FS, Varlamova AI. The effectiveness of supramolecular complexes of triclabendazole with polymers against *Fasciola*. Russian Journal of Parasitology. 2017; 41(3): 271-276. Russian (Мусаев М.Б., Миленина М.В., Архипов И.А., Халиков С.С., Михайлицын Ф.С., Варламова А.И. Эффективность супрамолекулярных комплексов триклабендазола с полимерными наполнителями при фасциолёзе // Рос. паразитологический журн. 2017. Т. 41, № 3. С. 271-276).
- Thakahova AA, Bittirova AA, Berezhko VK, Bittirov AM. Specific helminth composition and infection rates among sheep in mountain tracts of the Kabardino-Balkaria at the altitude of 1200-2500 above sea level. Theory and Practice of Struggle With Parasitic Diseases. 2017; (18): 492-495. Russian (Тхакахова А.А., Биттирова А.А., Бережко В.К., Биттиров А.М. Видовой состав гельминтов и зараженность овец в горных урочищах Кабардино-Балкарии на высоте 1200-2500м н.у. моря // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2017. Вып. 18. С. 492-495).
- Ustinov AM, Safullin RT, Safullin RR. Prevalence of *Fasciola hepatica* and *Hypoderma bovis* infections at farms of the Kaluga Region. Theory and Practice of Struggle With Parasitic Diseases. 2017; (18): 502-506. Russian (Устинов А.М., Сафиуллин Р.Т., Сафиуллин Р.Р. Распространение фасциолёза и гиподерматоза крупного рогатого скота в хозяйствах Калужской области // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2017. Вып. 18. С. 502-506).
- Bibik OI, Nacheva LV. Widespread parasitic diseases in Kuzbass (measures of struggle and prevention). Kemerovo, 2010. 63 p. Russian (Бибик О.И., Начева Л.В. Паразитарные болезни, распространенные на территории Кузбасса (меры борьбы и профилактики). Кемерово, 2010. 63 с.).
- McConville M, Hanna REB, Brennan GP, McCoy M, Edgar HWJ, McConnell S, et al. *Fasciola hepatica*: Disruption of spermatogenesis by the fasciolicide, compound alpha. Parasitology Res. 2010; 106(2): 311-323.
- Savage J, Meaney M, Brennan GP, Hoey E, Trudgett A, Fairweather I. Increased action of triclabendazole (TCBZ) in vitro against a TCBZ-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-incubation with the P-glycoprotein inhibitor, R(+)-verapamil. Exp Parasitol. 2013; 135(3): 642-653.
- Nacheva LV, Bibik OI, Grebenshchikov VM. Anthelmintics and their effects on organs and tissues of *Opisthorchis felinus* (histological and histochemical studies). Kemerovo, 2000. 93 p. Russian (Начева Л.В., Бибик О.И., Гребенщикова В.М. Антигельминтики, эффективность их действия на органы и ткани *Opisthorchis felinus* (гистологические и гистохимические исследования). Кемерово, 2000. 93 с.).
- Bibik OI, Nacheva LV, Arkhipov IA. Pathomorphology of bodies and tissues of *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum cervi* after antitrem treatment. Russian Journal of Parasitology. 2012; (1): 13-20. Russian (Бибик О.И., Начева Л.В., Архипов И.А. Патоморфология органов и тканей *Fasciola hepatica* и *Paramphistomum cervi* после воздействия антитрема // Рос. паразитологический журн. 2012. № 1. С. 13-20).
- Bibik OI, Arkhipov IA. Micromorphofunctional peculiarities of *Fasciola hepatica* male reproductive system organs following the action of benzimidazole based anthelmintics. Theory and Practice of Struggle With Parasitic Diseases. 2017; (18): 59-62. Russian (Бибик О.И., Архипов И.А. Микроморфофункциональные особенности органов мужской половой системы фасциол после действия антигельминтиков – бензимидазолов // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2017. Вып. 18. С. 59-62).
- Hanna R. *Fasciola hepatica*: Histology of the Reproductive Organs and Differential Effects of Triclabendazole on Drug-Sensitive and Drug-Resistant Fluke Isolates and on Flukes from Selected Field Cases Pathogens. 2015; 4(3): 431-456.
- Scarcella S, Hanna REB, Brennan GP, Solana H, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: Histological changes in the somatic and reproductive tissues of liver fluke following closantel treatment of experimentally-infected sheep. Vet Parasitol. 2016; 215: 38-47.
- Bibik OI, Nacheva LV. Methodological recommendations on the detection of trematodocytic efficacy of anthelmintic agents by the morphometric analysis of the eggs of trematodes after the action of the drug. Russian Journal of Parasitology. 2009; (1): 102-106. Russian (Бибик О.И., Начева Л.В. Методические рекомендации по выявлению трематодоцидной эффективности антигельминтных средств методом морфометрического анализа яиц трематод после действия препарата // Рос. паразитологический журн. 2009. № 1. С. 102-106).

Сведения об авторах

Бибик Оксана Ивановна, доцент, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии с основами генетики и паразитологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: изготовление гистологических препаратов, проведение морфометрических замеров яиц, анализ исследования и написание статьи.

Штернис Татьяна Александровна, доцент, кандидат медицинских наук, доцент кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: статистический анализ, написание статьи.

Начева Любовь Васильевна, профессор, доктор биологических наук, заведующая кафедрой биологии с основами генетики и паразитологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: написание статьи.

Корреспонденцию адресовать:

Бибик Оксана Ивановна
ул. Ворошилова, д. 22а, г. Кемерово, 650056,
Россия
E-mail: ok.bibik@yandex.ru

Статья поступила: 24.02.18 г

Принята в печать: 31.05.18 г

Authors

Prof. Oksana I. Bibik, PhD, Professor, Department of Biology, Genetics, and Parasitology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: prepared tissue samples; performed the morphometry of eggs; wrote the manuscript.

Dr. Tatiana A. Shternis, MD, PhD, Associate Professor, Department of Epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed the statistical analysis; wrote the manuscript.

Prof. Lyubov V. Nacheva, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Biology, Genetics, and Parasitology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: wrote the manuscript.

Corresponding author:

Prof. Oksana I. Bibik,
22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation
E-mail: ok.bibik@yandex.ru

Acknowledgements: There was no funding for this project.