

# Морфофункциональные и биохимические показатели у золотистых хомячков при развитии холангиокарциномы, ассоциированной с описторхозом

Г.А. Максимова<sup>1</sup>, М.Ю. Пахарукова<sup>1</sup>, Е.В. Кашина<sup>1</sup>, Н.А. Жукова<sup>2</sup>, М.Н. Львова<sup>1</sup>, М.В. Хвостов<sup>2</sup>, Д.С. Баев<sup>2</sup>, А.В. Катохин<sup>1</sup>, Т.Г. Толстикова<sup>2</sup>, В.А. Мордвинов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск, Россия

Одной из ключевых проблем трансляционной медицины является обоснованность выбора экспериментальной модели заболеваний. Холангиокарцинома, или рак желчных протоков, занимает второе место по встречаемости среди злокачественных заболеваний печени. Существует прямая связь между раком желчных протоков и глистной инвазией печени, вызванной трематодами семейства описторхид. Недавно мы продемонстрировали, что при экспериментальном описторхозе, вызванном инвазией *Opisthorchis felineus*, на фоне диметилнитрозамина у золотистых хомячков *Mesocricetus auratus* возникает холангиокарцинома. Однако до сих пор нет описания данной экспериментальной модели с точки зрения возможности ее использования для исследования холангиокарциномы человека. Цель данной работы – изучение морфофункциональных и биохимических показателей у золотистых хомячков при формировании холангиокарциномы на фоне диметилнитрозамина и инвазии *O. felineus*. Эксперимент проводили в течение 30 нед при сочетанном действии 0,00125 % диэтилнитрозамина в питьевой воде и однократного введения 50 метациркаррий *O. felineus*. Показано, что при развитии холангиокарциномы (18 нед) увеличивается суммарное содержание базофилов, моноцитов и эозинофилов, относительное содержание гранулоцитов, содержание общего и прямого билирубина, а также уровень холестерина и АЛТ. При этом снижается относительное число лимфоцитов. Согласно результатам патоморфологического, морфометрического и биохимического анализа, выбранная модель демонстрирует показатели, близкие к обнаруженным у пациентов, страдающих холангиокарциномой на фоне хронического описторхоза. Таким образом, данная модель может быть использована для тестирования противораковых препаратов, исследования механизмов образования холангиокарциномы и поиска молекулярных маркеров для ранней диагностики рака желчных протоков.

Ключевые слова: холангиокарцинома; золотистые хомячки *Mesocricetus auratus*; описторхоз; печень

## The morphofunctional and biochemical characteristics of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma in a Syrian hamster model

G.A. Maksimova<sup>1</sup>, M.Y. Pakharukova<sup>1</sup>, E.V. Kashina<sup>1</sup>, N.A. Zhukova<sup>2</sup>, M.N. Lvova<sup>1</sup>, M.V. Khvostov<sup>2</sup>, D.S. Baev<sup>2</sup>, A.V. Katokhin<sup>1</sup>, T.G. Tolstikova<sup>2</sup>, V.A. Mordvinov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

The validity of experimental models of pathologies is one of the key challenges in translational medicine. Cholangiocarcinoma, or bile duct cancer, ranks second among oncological diseases of the liver. There is a strong association between bile duct cancer and parasitic infestation of the liver caused by trematodes in the family Opisthorchiidae. We have recently demonstrated that cholangiocarcinoma can develop in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by *Opisthorchis felineus* and administered with dimethylnitrosamine. However, there is still no description of how this experimental model can possibly be used in translational research. The aim of this work was to study the morphological, functional and biochemical characteristics during cholangiocarcinoma development in Syrian hamsters infected by *O. felineus* and administered with dimethylnitrosamine. The experiment lasted 30 weeks with combined exposure to dimethylnitrosamine in drinking water at a dose of 12.5 ppm and a single injection of 50 metacercariae *O. felineus*. It was shown that the development of cholangiocarcinoma (18 weeks) increased the total number of basophils, eosinophils and monocytes, the relative number of granulocytes, the amount of total and direct bilirubin, and cholesterol and ALT levels, but reduces the relative number of lymphocytes. Based on pathological, morphometric and biochemical

analyses, our model has characteristics similar to those in patients with opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Thus, this model can be used to test anticancer drugs, to study the mechanisms of cholangiocarcinogenesis and to search for molecular markers for early diagnosis of bile duct cancer.

Key words: cholangiocarcinoma; Syrian hamsters *Mesocricetus auratus*; opisthorchiasis; liver.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Максимова Г.А., Пахарукова М.Ю., Кашина Е.В., Жукова Н.А., Львова М.Н., Хвостов М.В., Баев Д.С., Катохин А.В., Толстикова Т.Г., Мордвинов В.А. Морфофункциональные и биохимические показатели у золотистых хомячков при развитии холангиокарциномы, ассоциированной с описторхозом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):466-473. DOI 10.18699/VJ15.062

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Maksimova G.A., Pakharukova M.Y., Kashina E.V., Zhukova N.A., Lvova M.N., Khvostov M.V., Baev D.S., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A. The morphofunctional and biochemical characteristics of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma in a Syrian hamster model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):466-473. DOI 10.18699/VJ15.062

**Х**олангиокарцинома, или рак желчных протоков, занимает второе место по встречаемости среди злокачественных заболеваний печени и является агрессивным видом рака: быстро прогрессирующим и трудно поддающимся лечению. Как правило, холангиокарцинома выявляется только на поздних стадиях заболевания и большинство пациентов с этим диагнозом живет не более 5 лет. Основным способом лечения рака желчных протоков является операция по удалению опухоли.

Отмечается, что в мире увеличивается заболеваемость холангиокарциномой, однако знания об этом виде рака остаются фрагментарными (Khuntikeo et al., 2015). К причинам, ограничивающим развитие исследований по данной проблеме, следует отнести небольшое число моделей холангиокарциногенеза, доступных для исследований *in vivo*.

Известно, что существует тесная ассоциация между раком желчных протоков и глистной инвазией печени, вызванной трематодами *Clonorchis sinensis* и *Opisthorchis viverrini* (Platyhelminthes: Trematoda: Opisthorchiidae) (Flavell, Lucas, 1982; Sripa et al., 2007; Aunpromma et al., 2012). Эти гельминты вызывают чрезвычайно близкие по симптоматике заболевания – клонорхоз и описторхоз. В России широко распространен еще один возбудитель описторхоза, *O. felineus*, который также является представителем семейства Opisthorchiidae. Самый большой очаг описторхоза, вызванного *O. felineus*, расположен на территории Западной Сибири в Обь-Иртышском бассейне (Mordvinov, Furman, 2010).

Печеночные сосальщики *C. sinensis*, *O. viverrini* и *O. felineus* паразитируют в желчных протоках печени и желчном пузыре человека и рыбаобразных млекопитающих. Международное агентство по исследованию рака классифицировало *O. viverrini* и *C. sinensis* как канцерогенные факторы первой группы опасности (IARC, 2012) и как основные факторы развития холангиокарциномы в эндемичных регионах.

Недавно мы продемонстрировали, что при экспериментальном описторхозе, вызванном *O. felineus*, на фоне действия диметилнитрозамина у золотистых хомячков *Mesocricetus auratus* возникает холангиокарцинома (Максимова и др., 2015). Однако до сих пор нет описания данной экспериментальной модели с точки зрения

возможности ее использования как модели для холангиокарциногенеза у людей.

Цель данной работы – изучение морфофункциональных и биохимических показателей у золотистых хомячков при формировании холангиокарциномы на фоне действия диметилнитрозамина и инвазии *O. felineus*. Результаты этого исследования необходимы для проведения сравнительного анализа с опубликованными данными по развитию холангиокарциномы у людей и оценки перспективности выбранной экспериментальной модели холангиокарциногенеза для трансляционных исследований. Выбор и развитие адекватной экспериментальной модели открывают новые возможности для поиска молекулярных маркеров рака желчных протоков и разработки систем ранней диагностики этого заболевания.

#### Материалы и методы

Работа проведена на 6–8-недельных хомячках-самцах вида *Mesocricetus auratus*, полученных из SPF-вивария г. Пущино (РФ). Животных содержали по 5 особей в клетке при стандартных условиях и свободном доступе к корму и воде. Протокол экспериментальных работ был одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 7 от 19 декабря 2011 г.).

Метацеркарии *Opisthorchis felineus* выделяли из подкожной мышечной ткани естественно зараженных язей *Leuciscus idus*, пойманных в р. Обь в черте г. Новосибирска. Ткани рыб обрабатывали раствором пепсина при 37 °С, метацеркарии промывали физиологическим раствором и подсчитывали (Sripa, Kaewkes, 2000). Хомячков заражали *per os* в дозе 50 метацеркарий на животное.

Животные, находившиеся под воздействием диметилнитрозамина (ДМН), были размещены в отдельном помещении. ДМН растворен в воде до итоговой концентрации 0,00125 %. Свежий раствор ДМН готовили каждый день, помещали в непрозрачные бутылки и давали хомячкам вместо питьевой воды *ad libitum*.

Из 155 хомячков сформировали четыре группы. Группа I – контрольные животные, группа II – животные, получавшие раствор ДМН, группа III – животные, зараженные *O. felineus*, группа IV – животные, находившиеся под сочетанным влиянием *O. felineus* и ДМН. В начале эксперимента проводили заражение животных в группах

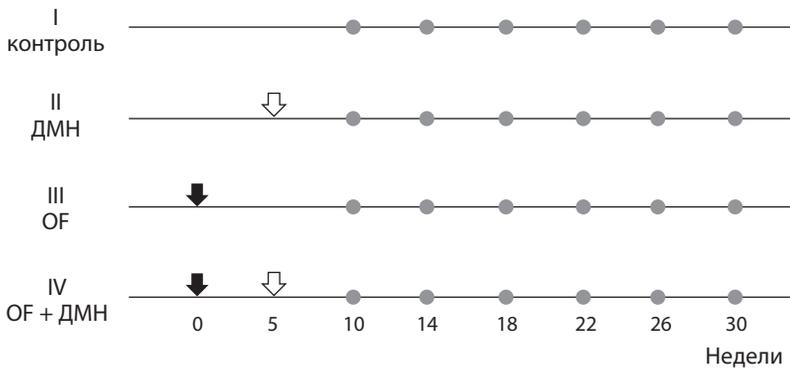


Рис. 1. Схема эксперимента.

Черная стрелка – введение *O. felineus*, белая стрелка – введение ДМН, серые точки – точки выведения животных из эксперимента.

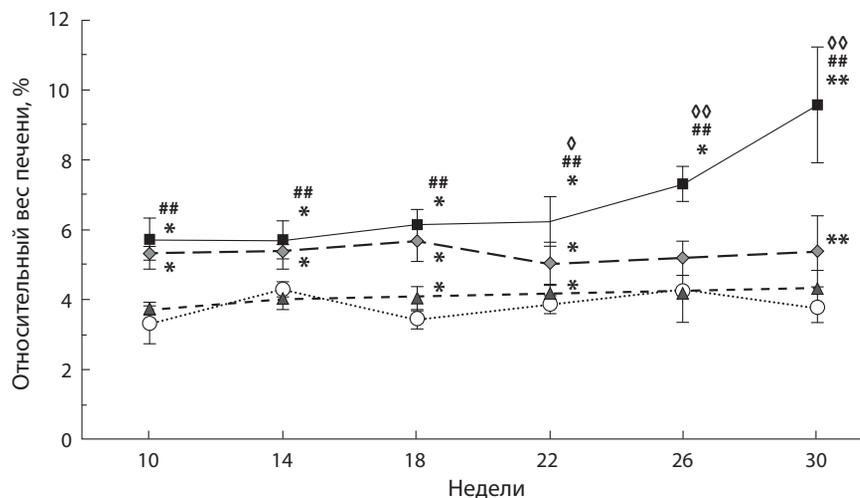


Рис. 2. Относительный вес печени (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) по группам животных: I (○) – контроль; II (▲) – ДМН; III (◇) – *O. felineus*; IV (■) – *O. felineus* + ДМН.

\* – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II; ◇ – сравнение с группой III. \*, #, ◇  $p < 0,05$ ; \*\*, ##, ◇◇  $p < 0,01$ .

III и IV. Через месяц проверяли заражение хомячков модифицированным методом эфир-уксусной копроовоскопии (Павлюков, Березанцев, 1991). После подтверждения заражения для групп II и IV питьевую воду заменяли раствором ДМН. Животных выводили из эксперимента через 10, 14, 18, 22, 26, 30 недель от его начала (рис. 1) по 4–5 особей из контрольной группы и по 6 особей из каждой из остальных трех групп.

При каждом заборе биоматериала взвешивали животное и его печень. Вес селезенки определяли только через 26 и 30 недель. Кровь на общий анализ забирали из орбитального синуса для измерения 18 параметров периферической крови. Для проведения анализа 20 мкл цельной крови каждого животного разводили в 1,6 мл разбавителя («Изотонический разбавитель» Реамед, Россия). Полученные образцы анализировали на автоматическом гематологическом анализаторе URIT-2900 (Guilin Botest Medical Electronic Co., Ltd., Китай). Для биохимического анализа использовали сыворотку крови. Пробы обрабатывали согласно протоколам, представленным производителями: общий и прямой билирубин (Вектор Бест, Россия); холестерин общий, глюкоза, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ) (Ольвекс Диагностикум, Россия); общий белок, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (Bioscop, Германия). Измерения проводили на спектрофотометре Stat Fax 3 300 (Awareness Technology, США).

Для исследований патологических изменений печень фиксировали в забуференном 10 %-м формалине (Biovitrum, Россия). После фиксации в течение 16–18 ч при 4 °C образцы обезвоживали в серии возрастающего градиента этилового спирта и ксилола (Союзхимпром, Россия), затем изготавливали парафиновые блоки (Biovitrum, Россия) с использованием гистологического комплекса Microm (Microm, Великобритания). Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Готовые препараты исследовали под световым микроскопом Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия).

Данные по весу животного, относительному весу печени и селезенки, общему и биохимическому анализу крови подвергали статистическому анализу с использованием программы Statistica 6.0 (Statsoft, США), визуализировали с помощью Microsoft Office Excel 2007 и Microsoft Office PowerPoint 2007 (Microsoft, США). Достоверность различий между экспериментальными группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни ( $p < 0,05$ ) с использованием программы Statistica 6.0 (Statsoft, США).

## Результаты

Начиная с 10-й нед эксперимента относительный вес печени хомячков, зараженных описторхами (группы III и IV), был почти в 2 раза выше, чем у контрольных животных (рис. 2). Эти различия сохранялись на протяжении практически всего срока эксперимента. Самые высокие значения относительного веса печени наблюдали в группе IV, находящейся под сочетанным влиянием *O. felineus* и диметилнитрозамина (ДМН). У животных этой группы с 22-й нед и до конца эксперимента относительный вес печени был достоверно выше, чем у животных всех остальных групп (рис. 2), и на 30-й нед был примерно в 3 раза выше, чем у контрольных животных.

На 26-й и 30-й неделях эксперимента было обнаружено достоверное увеличение относительного веса селезенки у животных групп II, III и IV по сравнению с контрольными животными. Достоверное увеличение селезенки также выявлялось при сравнении группы IV с группами II и III (таблица).

Относительный вес селезенки

Недели	I группа, %	II группа, %	III группа, %	IV группа, %
26	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01*	0,11 ± 0,02*	0,16 ± 0,02*##∅
30	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01*	0,11 ± 0,02*	0,31 ± 0,19**##∅∅

Данные представлены в виде (среднее ± стандартное отклонение). \* – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II; ∅ – сравнение с группой III. \*, #, ∅  $p < 0,05$ ; \*\*, ##, ∅∅  $p < 0,01$ .

При макроскопическом исследовании печени животных между группами были обнаружены выраженные различия по цвету ткани, желчи и состоянию желчных протоков. Важным показателем было состояние поверхности ткани печени и ее краев. У контрольных животных, а также животных, находившихся под действием ДМН, поверхность печени оставалась упругой, гладкой и блестящей; края органа были ровными, а внепеченочные желчные протоки и желчный пузырь – прозрачными, их стенки не были утолщены (рис. 3, а, б). В отличие от этих групп у животных с описторхозом, вне зависимости от добавления ДМН, желчные протоки были значительно утолщены и с первых недель эксперимента теряли прозрачность. Начиная с 18-й нед поверхность печени становилась мелкобугристой, края органа – неровными, желчь была темного цвета (рис. 3, в). В группе с сочетанным действием гельминтов и ДМН начиная с 26-й нед наблюдали плотные бугристые бело-желтые образования с неровными контурами (рис. 3, г), число и размер этих образований к 30-й нед существенно увеличивались. Следует отметить, что у двух из шести животных под действием ДМН также были обнаружены бело-желтые образования на поверхности ткани печени, однако только на 30-й неделе.

При гистологическом исследовании в отличие от контрольных животных в печени животных, зараженных описторхами, вне зависимости от добавления ДМН с 10-й нед эксперимента обнаружен высокий уровень пролиферации клеток эпителия желчных протоков и овальных клеток. Стенки желчных протоков у инфицированных животных были сильно утолщены за счет перидуктального фиброза. В просветах желчных протоков инфицированных животных

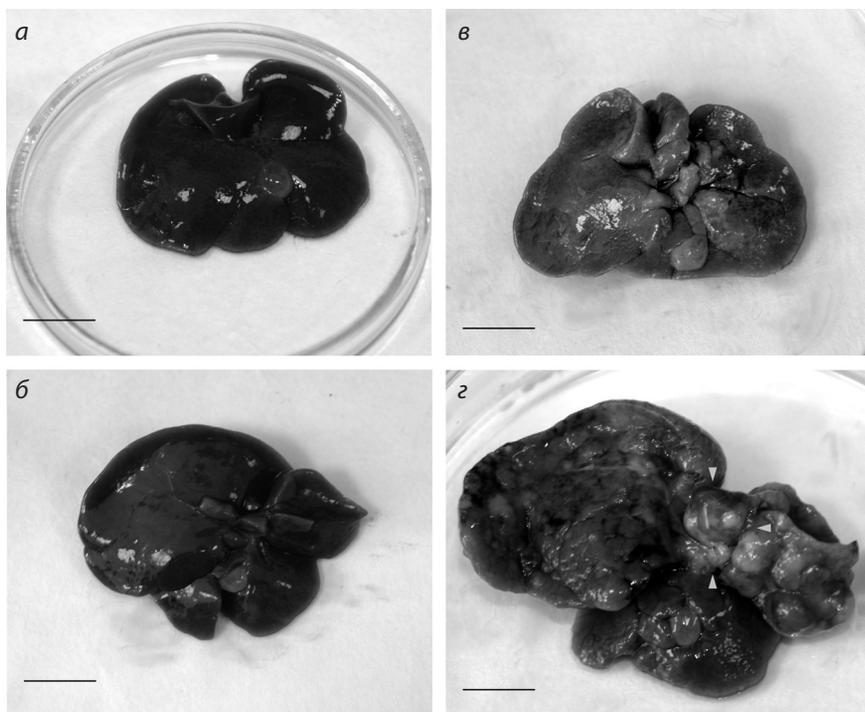


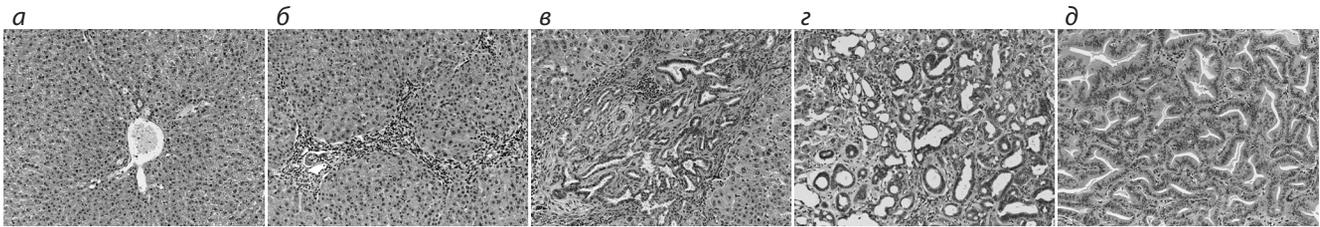
Рис. 3. Макпрепараты печени на 30-й неделе эксперимента.

а – группа I (контроль); б – группа II (ДМН); в – группа III (*O. felineus*); г – группа IV (*O. felineus* + ДМН). Масштабная линейка 1 см.

были выявлены полипозные разрастания различной величины, состоящие из фибробластов, окруженных прослойками соединительнотканых волокон, инфильтрированные яйцами паразита и темным пигментом.

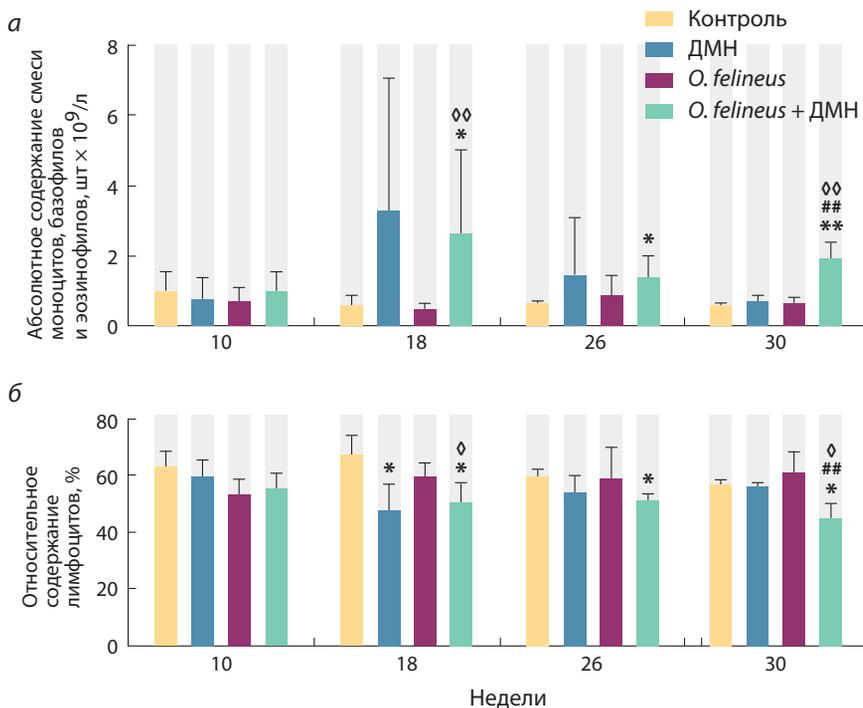
В группе, находящейся под сочетанным влиянием гельминтов и ДМН, гиперпластические эффекты были более выражены, чем в других группах. У животных на 18-й нед мы наблюдали дисплазию гепатоцитов, был обнаружен холангиофиброз, образованный желчными протоками с прослойками соединительной ткани. На этом сроке эксперимента были отмечены первые признаки злокачественности патологических образований – нерегулярность в строении новообразованных желчных ходов, а также исчезновение плазматической мембраны у некоторых протоков (рис. 4, б). У двух хомячков с плотными бело-желтыми образованиями в печени на 26-й нед была найдена дифференцированная холангиоцеллюлярная карцинома. Опухоль демонстрировала инфильтративный рост (рис. 4, г). У всех животных группы IV к 30-й нед были найдены холангиоцеллюлярные опухоли (рис. 4, д).

В отличие от этого у животных, получавших только ДМН, отмечены дисплазия гепатоцитов и отдельные мелкоочаговые некрозы гепатоцитов. У них на 26-й нед была зафиксирована небольшая пролиферация желчных протоков. Однако в целом у животных без гельминтной инвазии не было активной пролиферации клеток печени и признаков фиброза. Таким образом, первые



**Рис. 4.** Гистопатологические изменения в печени.

Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$ . *a* – группа I (контроль), 30-я неделя, портальный тракт; *б* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 10-я неделя, пролиферация желчных протоков; *в* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 18-я неделя, холангиофиброз; *з* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 26-я неделя, фрагмент холангиокарциномы; *д* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 30-я неделя, фрагмент холангиокарциномы.



**Рис. 5.** Показатели общего анализа крови: абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов (*a*); относительное содержание лимфоцитов (*б*) (среднее  $\pm$  стандартное отклонение).

\* – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II;  $\diamond$  – сравнение с группой III. \*, #,  $\diamond$   $p < 0,05$ ; \*\*, ##,  $\diamond\diamond$   $p < 0,01$ .

признаки злокачественных образований эпителия желчных протоков были обнаружены в печени хомячков, находящихся под сочетанным действием ДМН и описторхоза, уже на 18-й нед эксперимента, а на 26-й нед в этой группе животных найдены холангиокарциномы.

Был проведен комплексный анализ показателей клеточного состава крови животных по 18 показателям. Большинство показателей общего анализа крови (абсолютное содержание лимфоцитов, абсолютное содержание эритроцитов, гематокрит, концентрация гемоглобина в крови, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцита, относительная ширина распределения эритроцитов по объему – стандартное отклонение и коэффициент вариации, абсолютное содержание тромбоцитов, тромбокрит, средний объем тромбоцитов) в нашем случае не изменились и достоверной разницы между группами животных не демонстрировали (данные не приведены).

Однако ряд показателей клеточного состава крови менялся в ходе эксперимента. Так, обнаружено, что с 18-й нед достоверно увеличивается суммар-

ный показатель содержания смеси базофилов, моноцитов и эозинофилов у группы животных, находящихся под сочетанным воздействием *O. felineus* и ДМН. В группе IV на 30-й нед исследования этот показатель был в три раза выше, чем у животных остальных групп (рис. 5, *a*). В группе II также наблюдали увеличение этого показателя на сроках 18 и 26 нед, однако оно было недостоверным.

Увеличение абсолютного содержания смеси базофилов, моноцитов и эозинофилов у животных экспериментальных групп хорошо согласуется с повышением относительного содержания гранулоцитов. Рост этого показателя у животных экспериментальных групп также был зарегистрирован с 18-й нед эксперимента (данные не приведены). Важным показателем, который с 18-й нед достоверно изменялся у животных, находящихся под сочетанным действием ДМН и *O. felineus*, было снижение относительного числа лимфоцитов (рис. 5, *б*).

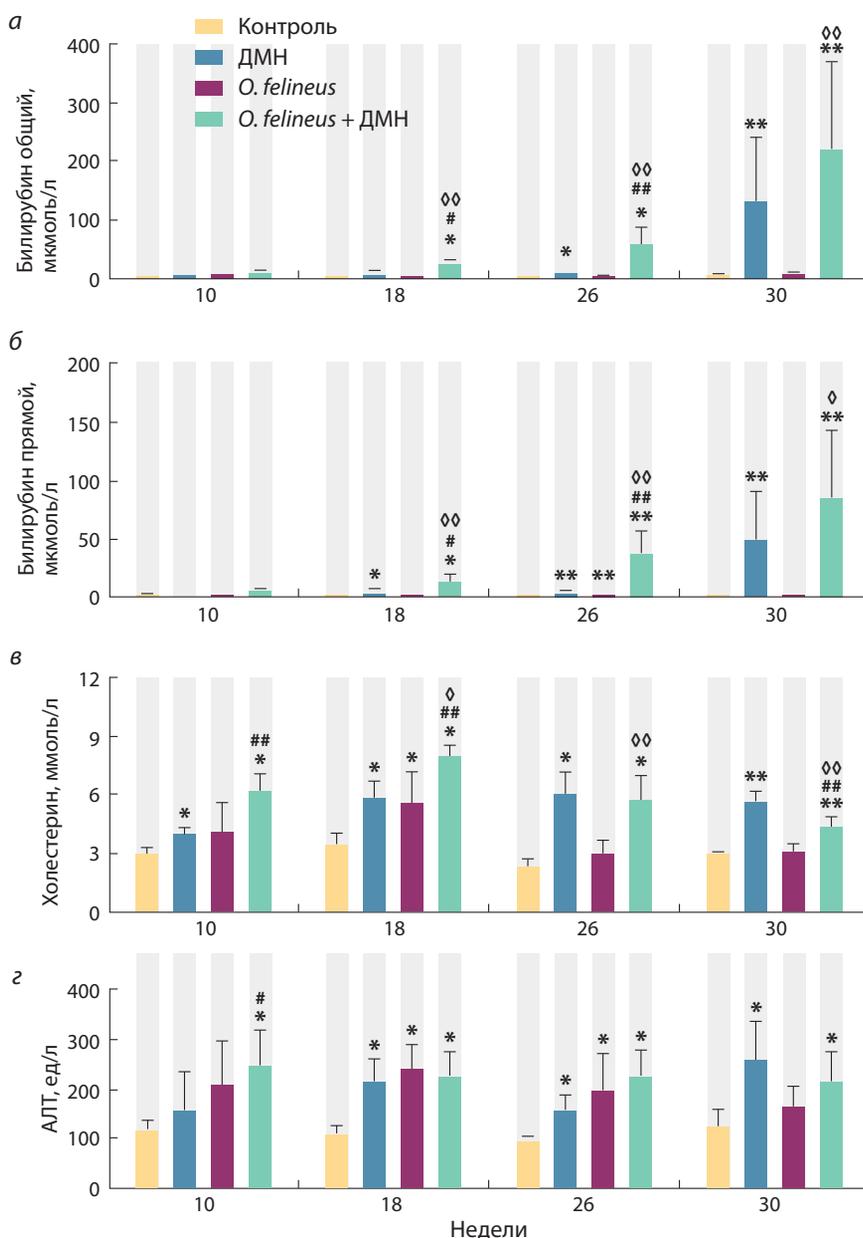
В ходе работы был проведен также комплексный биохимический анализ крови животных по 9 показателям. В результате проведенного исследования был выявлен ряд существенных изменений в группе IV. В частности уровни прямого и общего билирубина в норме близки к нулю, что и было зафиксировано практически на всех сроках эксперимента в группе контроля и группах, находящихся под воздействием только гельминтов или только ДМН (рис. 6, *a, б*). В отличие от этого в группе, находящейся под сочетанным влиянием *O. felineus* и ДМН, уровень общего билирубина начинает увеличиваться с 18-й нед эксперимента. Важно отметить, что начало роста этого показателя совпа-

дает с появлением первых признаков злокачественности патологических образований, обнаруженных при гистологическом исследовании. У животных на 26-й нед величина общего билирубина составляет около 60 мкмоль/л, а к концу эксперимента – уже свыше 200 мкмоль/л. Изменение уровня прямого билирубина в значительной мере совпадает с динамикой общего билирубина (рис. 6, в). Таким образом, важным биохимическим показателем, ассоциированным с развитием холангиокарциномы, является, по-видимому, уровень билирубина.

На ранних сроках эксперимента (10–18 нед) у животных группы IV по сравнению с животными остальных групп был существенно повышен уровень холестерина (рис. 6, в). Кроме того, в группе IV в отличие от других групп с 14-й нед и до конца эксперимента был повышен общий белок крови. У животных этой группы по отношению к контрольным животным был отмечен также пониженный уровень глюкозы (данные не приведены).

Во всех экспериментальных группах относительно контроля был зарегистрирован повышенный уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ). Отметим, что у животных группы IV на ранних сроках эксперимента (10-я нед) показатель АЛТ был наибольшим (рис. 6, г). Достоверных различий в уровнях других ферментов печени (аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза и лактатдегидрогеназа) между всеми группами не выявлено.

На основании полученных данных можно заключить, что при развитии холангиокарциномы (группа IV) увеличивается суммарный показатель содержания базофилов, моноцитов и эозинофилов, повышается относительное содержание гранулоцитов, однако относительное число лимфоцитов снижается. При формировании холангиокарциномы происходит также повышение содержания общего и прямого билирубина, а также уровня холестерина и АЛТ. Изменение наибольших численных показателей начинается с 18-й нед эксперимента, что совпадает со временем появления первых признаков злокачественности патологических образований печени.



**Рис. 6.** Биохимические показатели крови: билирубин общий (а); билирубин прямой (б); холестерин (в); АЛТ (г) (среднее ± стандартное отклонение).

\* – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II; ◇ – сравнение с группой III. \*, #, ◇  $p < 0,05$ ; \*\*, ##, ◇◇  $p < 0,01$ .

Однако еще до появления этих признаков у животных группы IV были зарегистрированы повышенные уровни холестерина и АЛТ.

### Обсуждение

Возникновение рака желчных протоков у золотистых хомячков при сочетанном воздействии *O. felineus* и ДМН хорошо объясняется классической трехстадийной теорией канцерогенеза. Согласно этой теории, злокачественные опухоли развиваются при синергическом воздействии двух агентов. Один из них является инициатором опухолеиндуцирующего события, а второй способствует пролиферации иницированных клеток, т. е. обладает свойствами промотора опухолей.

В модели холангиокарциномы с использованием золотистых хомячков инициатор возникновения злокачественных клеток – ДМН, соединение,

обладающее генотоксическим действием. Известно, что ДМН содержится в большом количестве в окружающей среде, в пище и сигаретном дыме. Таким образом, человек каждый день сталкивается с этим соединением и выбор ДМН в качестве инициатора опухолеиндуцирующего события вполне оправдан.

Однако для опухолевого роста необходимы определенные условия, способствующие митозу инициированных клеток. Такие условия, судя по всему, возникают при описторхозе. Действительно, печень больных описторхозом значительно увеличивается в размерах, клетки протоков активно пролиферируют и иногда формируют кисты. Очень близкая картина патологических изменений печени регистрируется и при экспериментальном описторхозе с использованием золотистых хомячков.

Кроме того, показано, что отдельные белки описторхов могут оказывать митогенный и антиапоптотический эффект на клетки хозяина, действуя как классический митоген (Smout et al., 2009, Srira et al., 2012). В нашем исследовании также были выявлены пролиферация желчных протоков, гиперплазия и метаплазия эпителия желчных протоков, холангиофиброз и полипы. Таким образом, гельминты *O. felinus* способны стимулировать пролиферацию клеток и тем самым индуцировать предраковые изменения (Lvova et al., 2012). Найденные изменения в печени, появившиеся под влиянием *O. felinus* и при сочетанном воздействии гельминтов и ДМН, схожи с патологическими изменениями, описанными при инвазии других печеночных сосальщиков – *O. viverrini* и *C. sinensis* (Thamavit et al., 1978; Lee et al., 1993; Songserm et al., 2009).

В нашей работе была выявлена ассоциация между увеличением веса селезенки и развитием холангиокарциномы. В литературе нет единства по этому вопросу. Так, есть сведения, что при холангиокарциноме на фоне описторхоза спленомегалия встречается, но довольно редко (Шайн, 1974). По данным других авторов, при развитии гнойных осложнений у пациентов с длительной инвазией *O. felinus* спленомегалия встречается часто (Бражникова, 1997). Интересно, что при инвазии *O. viverrini* вес селезенки не изменяется ни у хомячков (Flavell, Flavell, 1986), ни у людей (Upatham et al., 1982). Однако под влиянием *C. sinensis* у людей селезенка увеличивается (Rohela et al., 2006), но увеличение происходит не у всех пациентов, страдающих клонорхозом (Wang et al., 2004).

По нашим данным, показатели общего и биохимического анализа крови по экспериментальным подгруппам были преимущественно стабильны. Постоянство этих параметров крови описано также при хроническом описторхозе у людей (Поддубная 2009; Щёголева и др., 2009; Поддубная, Щёголева, 2011).

В то же время существуют данные, что у пациентов с хроническим описторхозом при таких осложнениях, как абсцесс и холангиокарцинома, изменялись клеточные и биохимические показатели крови (Бражникова, Толкаева, 2000; Бражникова, Толкаева, 2002; Цхай и др., 2011). По нашим данным, в группе хомячков, подверженных сочетанному влиянию *O. felinus* и ДМН, отмечается повышение показателей гранулоцитов, а также смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов. Это может свидетельствовать о воспалительном процессе, что согласуется

с данными при воспалительных процессах, сопровождающих абсцессы и холангиокарциному у людей (Альперович и др., 2010; Цхай и др., 2011).

Отмеченное в данной работе снижение числа лимфоцитов в крови хомячков группы IV также согласуется с данными, полученными при холангиоцеллюлярном раке печени у людей (Бражникова, Толкаева, 2002; Альперович и др., 2010). То же самое можно сказать о повышении уровня билирубина, АЛТ и холестерина у животных группы IV. Рост этих показателей зарегистрирован у пациентов с хроническим описторхозом (Бакштановская и др., 2002; Бакштановская, Степанова, 2005). При этом аспартатаминотрансфераза (АСТ) и лактатдегидрогеназа зачастую остаются в норме (Бакштановская и др., 2002; Бакштановская, Степанова, 2005; ) или у некоторых пациентов бывает повышен лишь уровень АСТ (Поддубная, 2009; Soukhathammavong et al., 2015). При выполнении данной работы нами получены аналогичные данные.

При хроническом описторхозе и холангиокарциноме у людей зачастую повышен уровень щелочной фосфатазы (ЩФ) (Бражникова, Толкаева, 2000; Бакштановская и др., 2002; Бакштановская, Степанова, 2005). Мы не обнаружили существенных изменений этого показателя у животных экспериментальных групп. Есть сведения, что у людей при инвазии *O. viverrini* уровень ЩФ тоже может не подниматься (Soukhathammavong et al., 2015).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что согласно результатам патоморфологического, морфометрического и биохимического анализа модель холангиокарциномы на фоне действия ДМН и *O. felinus* с использованием золотистых хомячков демонстрирует показатели, близкие к обнаруженным у пациентов, страдающих холангиокарциномой на фоне хронического описторхоза.

Таким образом, данная модель может быть использована для тестирования противораковых препаратов, исследования механизмов образования холангиокарциномы и поиска молекулярных маркеров для ранней диагностики рака желчных протоков.

## Благодарности

Работа выполнена при частичной поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН VI.60.1.1. (№ гос. регистрации 01201280335), гранта партнерских исследований СО РАН (№ 19), при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ №15-04-03551а.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Альперович Б.И., Бражникова Н.А., Цхай В.Ф., Мерзликин Н.В., Толкаева М.В., Клиновицкий И.Ю. Хирургические аспекты осложненного и сопутствующего хронического описторхоза. СГМУ. Томск, 2010.

- Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф. Анализ комплекса биохимических показателей функций печени при хроническом описторхозе. Мед. паразитол. паразит. бол. 2005;(4):18-21.
- Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., Шонин А.Л., Терехина В.К., Пономарева О.В. Биохимическая характеристика функций печени при различных клинических формах хронического описторхоза. Мед. паразитол. паразит. бол. 2002;(1):12-15.
- Бражникова Н.А. Хирургические осложнения хронического описторхоза. Анн. хирург. гепат. 1997;(2):88-93.
- Бражникова Н.А., Толкаева М.В. Особенности клиники, диагностики и лечения описторхозных абсцессов печени. Анн. хирург. гепат. 2000;5(1):37-42.
- Бражникова Н.А., Толкаева М.В. Рак печени, желчных путей и поджелудочной железы при хроническом описторхозе. Бюл. сиб. мед. 2002;(2):71-77.
- Максимова Г.А., Жукова Н.А., Кашина Е.В., Львова М.Н., Катокхин А.В., Толстикова Т.Г., Мордвинов В.А. Роль *Opisthorchis felineus* в индукции рака желчных протоков. Паразитология. 2015;49:3-11.
- Павлюков И.А., Березанцев Ю.А. Эфир-уксусный метод исследования фекалий на яйца описторхисов. Мед. паразитол. паразит. бол. 1991;3:57.
- Поддубная О.А. КВЧ-терапия фоновым резонансным излучением в хронореабилитации больных хроническим холециститом в сочетании с хроническим описторхозом. Бюл. сиб. мед. 2009;4(2):183-188.
- Поддубная О.А., Щёголева С.Ф. Комплексное немедикаментозное лечение больных с дисфункцией желчного пузыря при хроническом описторхозе. Бюл. сиб. мед. 2011;6:30-34.
- Цхай В.Ф., Бражникова Н.А., Мерзликин Н.В., Максимов М.А., Саипов М.Б., Еськов И.М., Хлебникова Ю.А. Описторхозные абсцессы печени. Бюл. сиб. мед. 2011;3:129-135.
- Шайн А.А. Семиотика первичного рака печени. Вопр. онкологии. 1974;20(9):50-56.
- Щеголева С.Ф., Поддубная О.А., Белобородова Э.И., Рехтина С.Д. Магнитотерапия в комплексном лечении больных хроническим описторхозом. Бюл. сиб. мед. 2009;3:121-127.
- Aunpromma S., Tangkawattana P., Papirom P., Kanjampa P., Tesana S., Sripa B., Tangkawattana S. High prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection in reservoir hosts in four districts of Khon Kaen Province, an opisthorchiasis endemic area of Thailand. Parasitol. Int. 2012;61:60-64. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.004
- Flavell D.J., Flavell S.U. *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. Parasite Immunol. 1986;8: 455-466.
- Flavell D.J., Lucas S.B. Potentiation by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, of the carcinogenic action of N-nitrosodimethylamine upon the biliary epithelium of the hamster. Br. J. Cancer. 1982;46(6):985-989.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. A review of human carcinogens. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012.100(B):1-441.
- Khuntikeo N., Chamadol N., Yongvanit P., Loilome W., Namwat N., Sithithaworn P., Andrews R.H., Petney T.N., Promthet S., Thinkhamrop K., Tawarunguang C., Thinkhamrop B. CASCAP investigators. Cohort profile: cholangiocarcinoma screening and care program (CASCAP). BMC Cancer. 2015;15:459. DOI: 10.1186/s12885-015-1475-7
- Lee J.H., Rim H.J., Bak U.B. Effect of *Clonorchis sinensis* infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in Syrian golden hamsters. Korean J. Parasitol. 1993;31(1):21-30. DOI: 10.3347/kjp.1993.31.1.21
- Lee J.H., Yang H.M., Bak U.B., Rim H.J. Promoting role of *Clonorchis sinensis* infection on induction of cholangiocarcinoma during two-step carcinogenesis. Korean J. Parasitol. 1994;32(1):13-18. DOI: 10.3347/kjp.1994.32.1.13
- Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. Parasitol. Int. 2012;61(1):167-172. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.005
- Mordvinov V.A., Furman D.P. The Digenea parasite *Opisthorchis felineus*: a target for the discovery and development of novel drugs. Infect. Disord. Drug Targets. 2010;10(5):385-401. DOI: 10.2174/187152610793180858
- Rohela M., Johari S., Jamaiah I., Init I., Lee S.H. Acute cholecystitis caused by *Clonorchis sinensis*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2006;37(4):648-651.
- Smout M.J., Laha T., Mulvenna J., Sripa B., Suttiprapa S., Jones A., Brindley P.J., Loukas A.A. A granulins-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells. PLoS Pathog. 2009;5(10):e1000611. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000611
- Songserm N., Prasongwattana J., Sithithaworn P., Sripa B., Pipitkool V. Cholangiocarcinoma in experimental hamsters with long-standing *Opisthorchis viverrini* infection. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2009;10(2):299-302.
- Soukhathammavong P.A., Rajpho V., Phongluxa K., Vonghachack Y., Hattendorf J., Hongvanthong B., Rasaphon O., Sripa B., Akkha-vong K., Hatz C., Odermatt P. Subtle to severe hepatobiliary morbidity associated with *Opisthorchis viverrini* infection in Southern Laos. Acta Trop. 2015;141(B):303-309. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.09.014
- Sripa B., Brindley P.J., Mulvenna J., Laha T., Smout M.J., Mairiang E., Bethony J.M., Loukas A. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* multiple pathways to cancer. Trends Parasitol. 2012;28(10):395-407. DOI: 10.1016/j.pt.2012.07.006
- Sripa B., Kaewkes S. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. Int. J. Parasitol. 2000;30(6):735-740. DOI:10.1016/S0020-7519(00)00054-0
- Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Paironkul C., Bhudhisawasdi V., Tesana S., Thinkamrop B., Bethony J.M., Loukas A., Brindley P.J. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. PLoS Med. 2007;4(7):e201. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040201
- Thamavit W., Bhamarapravati N., Sahaphong S., Vajrasthira S., Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. Cancer Res. 1978;38(12):4634-4639.
- Upatham E.S., Viyanant V., Kurathong S., Brockelman W.Y., Menaruchi A., Saowakontha S., Intarakhao C., Vajrasthira S., Warren K.S. Morbidity in relation to intensity of infection in *Opisthorchis viverrini*: study of a community in Khon Kaen, Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1982;31(6):1156-1163.
- Wang K.X., Zhang R.B., Cui Y.B., Tian Y., Cai R., Li C.P. Clinical and epidemiological features of patients with clonorchiasis. World J. Gastroenterol. 2004;10(3):446-448.