УДК 619:616.995.122.21

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЩЕЛОЧНОГО ГЕЛЬ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ХОЗЯИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПИСТОРХОЗЕ

Д.К. КУЖЕЛЬ
аспирант
В.В. ЗОРИНА
кандидат биологических наук
В.Я. БЕКИШ
доктор медицинских наук
Витебский государственный медицинский университет
Беларусь, г. Витебск, 210023, пр-т. Фрунзе, 27, e-mail: bekishvl@tut.by

При использовании щелочного гель-электрофореза изолированных клеток установлено, что метаболиты марит кошачьего сосальщика обладают генотоксическим воздействием на соматические клетки золотистых хомяков. Генотоксическое воздействие в клетках крови животных наблюдали на 7, 14, 21, 28, 35, 60, 90, 120 и 150-е сутки инвазии с максимальной выраженностью в 8,2 раза на 14-е сутки. В клетках костного мозга показатель «момента хвоста комет» в 1,9–6,5 раза превышал контрольные величины с максимальной выраженностью на 21-е сутки. В печени максимальный генотоксический эффект в 7,1 раза отмечали на 14-е сутки. В клетках крови, костного мозга и печени животных при экспериментальном описторхозе повышается уровень апоптотических клеток, обусловленный цитотоксическим эффектом инвазии. Цитотоксическое воздействие метаболитов марит кошачьего сосальщика регистрировали на 7, 14, 21, 28, 35, 60, 90, 120 и 150-е сутки инвазии в крови с максимальной выраженностью этих изменений на 21-е сутки в 8,3 раза. В костном мозге максимальную степень апоптоза клеток в 10,5 раз наблюдали на 14 и 28-е сутки инвазии. Апоптоз клеток печени у зараженных животных превышал в 2,3–6,2 раза уровни контроля с максимальной выраженностью этих изменений на 28-е сутки наблюдений.

Ключевые слова: описторхоз, метод «ДНК-комет», золотистые хомяки, генотоксическое и цитотоксическое воздействия.

Хронический описторхоз – это заболевание, вызываемое трематодой *Opisthorchis felineus*, паразитирующей в протоках печени, желчном пузыре и поджелудочной железе, оказывающей аллергическое, механическое, нейрогенное воздействие с возможным присоединением вторичной инфекции и поражающей органы постоянного обитания гельминта, расположенные на путях его миграции, а также интактные органы и системы [7].

Человек заражается кошачьим сосальщиком при употреблении в пищу свежей, свежемороженой, вяленой или недостаточно термически обработан-

ной пресноводной рыбы. В организме человека сосальщик живёт в течение 20–30 лет. Основой питания паразита служит гликоген печени. Для поддержания гомеостаза ему требуется кислород, который червь получает из кровеносного русла человека [9].

В Республике Беларусь пораженность населения кошачьим сосальщиком за последние 12 лет по данным Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья находится в пределах от 3 до 52 случаев в год [10].

Впервые в 1981 г. Н.Н. Ильинских [4] показал, что инвазия метацеркариями *O. felineus* вызывает в клетках костного мозга золотистых хомяков повышение числа клеток со вторичными нарушениями в структуре и числе хромосом. Наиболее значимые цитогенетические изменения отмечали на 60 и 120-е сутки инвазии. Они характеризовались увеличением хромосомных разрывов, транслокаций, а также уровней гипоплоидных, гиперплоидных и полиплоидных клеток. Добавление водно-солевого экстракта описторхисов в культуры лимфоцитов крови доноров приводило к нарушениям в наследственном аппарате в виде увеличения числа аберрантных и гипоплоидных клеток [5]. По мнению автора, описторхисы могли стать фактором, способным резко усилить мутационные процессы [3].

В 2006 г. была выявлена прямо пропорциональная зависимость у больных хроническим описторхозом между числом лимфоцитов периферической крови с цитогенетическими нарушениями и титрами антител к антигенам вируса Эпштейн–Барра [2]. Наиболее значимые изменения отмечали у больных с отягощёнными формами хронического описторхоза. Изучение изменений уровней первичных повреждений ДНК соматических клеток хозяина при паразитировании кошачьих сосальщиков, а также апоптотических клеток ранее не проводились.

Целью исследования было изучение возможных генотоксических и цитотоксических эффектов в соматических клетках хозяина при экспериментальном описторхозе.

Материалы и методы

Исследования проводили на 90 золотистых хомяках, которых разделили на две группы (контрольная и опытная) с одинаковым числом животных в каждой. Контрольной группе животных вводили внутрижелудочно 0,5 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Опытную группу разделили на девять подгрупп по 5 животных в каждой в зависимости от срока убоя. Всем подгруппам животных вводили внутрижелудочно жизнеспособных метацеркариев *O. felineus* из расчета 2 на 1 г массы тела животного по разработанному нами методу [6]. Исследования проводили на 7, 14, 21, 28, 35, 60, 90, 120 и 150-е сутки от заражения. На все сроки наблюдения хомяков умерщвляли путем декапитации под эфирным наркозом. Выделяли печень, бедренные кости. Взятие периферической крови из сонной артерии проводили при помощи вакутайнеров фирмы Monovette с Li-Heparin LH. Клеточные суспензии костного мозга и печени получали по разработанному методу [1, 8]. Щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод «ДНК-комет») проводили по N.P. Singh et al. в нашей модификации [1].

Повреждения молекулы ДНК определяли при помощи автоматической программы «CASP v. 1.2.2». В микропрепаратах ДНК-комет всех трех типов клеток подсчитывали по 50 клеток, где учитывали основной показатель генотоксичности: «момент хвоста», вычисленный программой из «длины хвоста», умноженного на процент ДНК в «хвосте кометы». Для оценки цитотоксического воздействия в 100 случайно выбранных клетках определяли процент апоптотических. Полученные данные от опытных животных сравнивали с показателями контрольной группы.

Результаты обрабатывали статистически с использованием программы Excel 2007. Рассчитывали среднюю арифметическую и ее стандартное отклонение (M+SD). Достоверность выявленных различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в клетках крови золотистых хомяков «длина хвостов комет» при инвазии достоверно повышалась в среднем в 1,2–2,7 раза с максимальными значениями на 7, 21 и 28-е сутки инвазии, а процент ДНК в «хвостах комет» – в 1,8–3,1 раза с наибольшими показателями на 7, 14 и 21-е сутки наблюдений. Основной показатель генотоксичности возрастал в 2,7–8,2, а цитотоксичности – в 2,6–8,3 раза (табл. 1).

1. Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток при описторхозе в крови золотистых хомяков

Сутки	Группа	Исследуемый показатель			
		Длина «хвостов комет» (в пикселях)	% ДНК в «хвостах комет»	«Момент хвоста комет»	% апоптотических клеток
7	Контроль	7,97±3,11	2,20±0,93	0,37±0,28	1,00±0,71
	Опыт	20,05±6,62*	6,87±1,23*	2,71±0,92*	2,60±0,89*
14	Контроль	10,08±2,18	2,62±0,96	0,35±0,15	1,20±0,84
	Опыт	14,82±3,08	7,45±2,67*	2,87±1,40*	4,60±0,89*
21	Контроль	10,64 ±0,94	2,58±0,59	0,49±0,18	1,20±0,84
	Опыт	12,89±0,68*	4,83±1,08*	1,34±0,39*	10,00±2,35*
28	Контроль	6,93±0 31	3,23±1,78	0,51±0,31	1,20±0,84
	Опыт	14,17±3,28*	5,23±1,49	1,55±0,81*	4,60±0,89*
35	Контроль	5,28 ±1,84	1,64±0,76	0,30± 0,24	0,80±0,45
	Опыт	14,27± 5,33*	4,28±2,06*	1,54±0,67*	2,00±0,71*
60	Контроль	5,12± 1,10	1,59±0,53	0,29±0,21	1,60±0,55
	Опыт	6,80± 0,21*	3,81±1,22*	1,91±0,91*	0,80±0,45*
90	Контроль	5,30±1,39	1,66±0,67	0,29±0,25	0,20±0,45
	Опыт	12,00±3,21*	3,94±0,81*	1,83±0,75*	1,40±0,55*
120	Контроль	5,01±1,36	1,50±0,72	0,21±0,13	0,80±0,84
	Опыт	11,44±1,55*	3,91±1,09*	1,71±0,79*	1,60±0,55*
150	Контроль	5,37±1,44	1,62±0,67	0,31±0,26	0,40±0,55
	Опыт	13,91±5,76*	3,43±1,03*	1,56±0,75*	1,80±0,45*

Примечание. * − достоверное отличие от данных контрольной группы при $P < 0,01–0,05$.

Исследование клеток костного мозга у золотистых хомяков также выявило достоверные изменения во все сроки наблюдений (табл. 2). В клетках костного мозга «длина хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» возрастали в 1,8–2,9 и 1,9–6,3 раза соответственно, основной показатель генотоксичности («момент хвоста») – в 1,9–14,4 раза, а процент апоптотических клеток – в 5,2–24 раза по сравнению с группой контроля.

В клетках печени «длина хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» увеличивались в 1,2–2,7 и 1,4–3,6 раза по отношению к контролю. Основной показатель генотоксичности превышал контрольные уровни на всех сроках наблюдения в 1,9–7,1, а цитотоксичности – в 2,3–6,2 раза (табл. 3).

2. Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток при описторхозе в костном мозге золотистых хомяков

Сутки	Группа	Исследуемый показатель			
		Длина «хвостов комет» (в пикселях)	% ДНК в «хвостах комет»	«Момент хвоста комет»	% апоптотических клеток
7	Контроль	6,99±1,81	1,27±0,58	0,14±0,08	0,60±0,55
	Опыт	20,41±4,93*	8,05±2,58*	4,46±2,33*	5,40±2,70*
14	Контроль	10,17±3,50	2,38±0,55	0,32±0,14	0,40±0,55
	Опыт	13,62±2,33	4,77±1,85*	1,69±1,03*	4,20±2,95*
21	Контроль	10,24±1,41	2,28±0,63	0,36±0,08	0,80±0,45
	Опыт	18,04±4,80*	6,69±1,59*	2,34±0,66*	4,20±1,10*
28	Контроль	9.63±2,03	3,63±1,32	0,52±0,37	0,40±0,55
	Опыт	14,31±1,13*	7,05±2,94*	2,84±1,69*	4,20±2,95*
35	Контроль	5,84±1,11	1,22±0,54	0,14±0,08	0,60±0,55
	Опыт	11,22±2,41*	3,08±0,63*	1,10±0,34*	4,40±1,82*
60	Контроль	5,38±0,91	1,05±0,55	0,11±0,07	0,40±0,55
	Опыт	7,46±0,34*	3,65±1,12*	1,59±0,72*	5,00±2,45*
90	Контроль	5,42±0,94	1,13±0,63	0,13±0,07	0,20±0,45
	Опыт	13,60±0,64*	3,50±0,81*	1,63±0,79*	4,80±2,28*
120	Контроль	4,78±0,57	0,96±0,45	0,10±0,05	1,20±0,40
	Опыт	13,98±0,91*	2,99±0,48*	1,32±0,49*	4,60±2,41*
150	Контроль	5,88±0,98	1,10±0,47	0,18±0,09	0,80±0,45
	Опыт	11,66±2,00*	3,56±1,34*	1,01±0,30*	4,20±1,79*

Примечание. * – достоверное отличие от данных контрольной группы при Р < 0,01–0,05.

3. Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток при описторхозе в печени золотистых хомяков (M±SD)

Сутки	Группа	Исследуемый показатель			
		Длина «хвостов комет» (в пикселях)	% ДНК в «хвостах комет»	«Момент хвоста комет»	% апоптотических клеток
7	Контроль	9,77±1,34	2,48±0,36	0,42±0,16	2,20±0,45
	Опыт	15,28±2,32*	5,10±1,28*	1,98±0,50*	8,20±1,79*
14	Контроль	6,80±2,79	1,72±1,36	0,23±0,21	1,60±0,89
	Опыт	18,29±1,53*	6,24±0,74*	1,65±0,39*	3,60±0,89*
21	Контроль	8,67±2,46	2,92±1,68	0,55±0,42	1,80±0,45
	Опыт	16,19±3,58*	5,39±0,93*	1,90±0,74*	10,60±7,06*
28	Контроль	10,28±3,45	2,32±0,52	0,45±0,18	1,80±0,45
	Опыт	13,30±2,04	5,88±2,35*	2,52±1,71*	11,20±3,70*
35	Контроль	7,69±1,14	1,81±0,26	0,42±0,16	2,20±0,45
	Опыт	10,29±1,95*	4,02±1,94*	1,22±0,45*	8,00±1,73*
60	Контроль	5,60±0,79	1,94±0,25	0,41±0,17	2,20±0,45
	Опыт	12,27±3,11*	2,83±0,59*	1,26±0,40*	8,20±1,79*
90	Контроль	6,22±0,61	2,17±0,26	0,42±0,16	1,60±0,55
	Опыт	11,36±3,22*	3,21±0,68*	1,21±0,38*	7,20±1,30*
120	Контроль	6,30±0,35	1,84±0,24	0,40±0,16	1,80±0,45
	Опыт	11,78±3,25*	2,64±0,40*	1,19±0,42*	7,40±1,52*
150	Контроль	7,85±0,75	1,90±0,26	0,42±0,11	2,00±0,00
	Опыт	9,65±1,51*	2,66±0,50*	0,81±0,34*	7,20±1,48*

Примечание. * – достоверное отличие от данных контрольной группы при Р < 0,01–0,05.

Наиболее выраженные генотоксические эффекты во всех исследуемых типах клеток наблюдали на 7, 14 и 28-е сутки наблюдений, а цитотоксический эффект – на 21 и 28-е сутки инвазии. На более поздние сроки наблюдения все исследуемые показатели во всех типах клеток были ниже, чем на ранние сроки, но достоверно превышали контрольные показатели. Исходя из полученных данных, мы можем предполагать, что до 28-го дня у хомяков протекала острая стадия заболевания, которая затем перешла в хроническую. Суммарно генотоксический и цитотоксический эффекты инвазии кошачьим сосальщиком раньше проявлялись в клетках крови и костного мозга и позднее наблюдались в клетках печени золотистых хомяков.

«Длина хвостов комет» при инвазии достоверно повышалась, в среднем, в 1,2–2,5 раза в клетках крови на 7, 21 и 28-е сутки инвазии, а процент ДНК в «хвостах комет» – в 1,8–3,1 раза на 7, 14 и 21-е сутки. Основной показатель генотоксичности возрастал в 2,7–8,2, а цитотоксичности – в 2,6–8,3 раза. В клетках костного мозга «длина хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» возрастали в 1,8–2,9 и 1,9–6,3 раза соответственно, основной показатель генотоксичности («момент хвоста») – в 1,9–6,5 раз, а процент апоптотических клеток в 5,3–10,5 раз. В клетках печени «длина хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» увеличивались в 1,6–2,7 и 1,8–3,6 раза по отношению к контролю. Основной показатель генотоксичности превышал контрольные уровни на всех сроках наблюдения в 3,5–7,1, а цитотоксичности – в 2,3–6,2 раза.

Полученные данные, характеризующие рост первичных повреждений ДНК и апоптоза соматических клеток хозяина, согласуются с результатами проведенных ранее исследований при других трематодозах. O.O. Motorna et al.[14] была изучена способность метаболитов *Fasciola hepatica* вызывать генные мутации в соматических клетках инвазированных млекопитающих. Исследования были проведены на трансгенных мышах-самцах, которых заражали в дозе 2 метацеркария печеночного сосальщика на особь. К 15-м суткам после заражения был установлен рост генных lacI мутаций в гепатоцитах зараженных животных по сравнению с контрольными. У инвазированных мышей в спектре мутаций значительно повышалось число lacI спонтанных и многократных мутаций (18,2 %) по сравнению с незараженными животными (2,8 %) [12, 13]. S.K. Lundy et al. [13] изучили апоптоз CD4± Т-лимфоцитов в течение шистосомозной инвазии у мышей-самок линии CBA/Jk. Животных заражали в дозе 25 церкариев *Schistosoma mansoni* и исследовали ранний апопотоз Т-лимфоцитов селезенки и клеток шистососмозных гранулем. Авторы показали, что в течение созревания личинок (4 нед после заражения) апоптоз в селезеночных CD4± Т-лимфоцитах не повышался, но многократно возрастал к 6-й неделе инвазии и коррелировал с временем попадания яиц в печень [13]. L. Chen et al. [11] в 2002 г. изучили особенности апоптоза в коже зараженных абдоминально 250 церкариями *S. mansoni* мышей линии C57BL/6. Установлено присутствие большого числа апоптотических клеток вокруг мигрирующих личинок паразитов и вокруг шистосомул у зараженных и иммунизированных животных. Иммуногистохимический анализ с использованием анти-CD3 антител показал, что большинство апоптотических клеток вокруг шистосомул у зараженных и иммунизированных животных являются Т-клетками [11].

Таким образом, метаболиты марит кошачьего сосальщика обладают генотоксическим воздействием на соматические клетки золотистых хомяков. Генотоксическое воздействие в клетках крови животных наблюдается на 7, 14, 21, 28, 35, 60, 90, 120 и 150-е сутки инвазии с максимальной выраженностью в 8,2 раза на 14-е сутки. В клетках костного мозга показатель «момента хвоста комет» в 1,9–14,4 раза превышал контрольные величины с максимальной выраженностью на 60-е сутки инвазии. В печени максимальный генотоксический эффект в 7,1 раза наблюдали на 14-е сутки инвазии.

В клетках крови, костного мозга и печени животных при экспериментальном описторхозе повышается уровень апоптотических клеток, обусловленный цитотоксическим эффектом инвазии. Цитотоксическое воздействие метаболитов марит кошачьего сосальщика отмечали на 7, 14, 21, 28, 35, 60, 90, 120 и 150-е сутки инвазии в крови с максимальной выраженностью этих изменений на 21-е сутки в 8,3 раза. В костном мозге максимальная степень апоптоза клеток в 10,5 раз наблюдали на 14 и 28-е сутки инвазии. Апоптоз клеток печени у зараженных животных превышал в 2,3–6,2 раза уровень контроля с максимальной выраженностью этих изменений на 28-е сутки наблюдений.

Литература

1. *Durnev A.D. i dr.* Primenenie metoda schelochnogo gel-elektroforeza izolirovannyh kletok dly ocenki genotoksicheskih svoystv prirodnyh i sinteticheskich soedineniy. Metod. rekomendacii. – M., 2006. – 27 s.
2. *Ilinskih E.N. i dr.* Vliynie associacii trematod *Opisthorchis felineus* i potencialno onkogennogo virusa Epschteyna Barr na uroven citogeneticheskih porazcheniy T-limfocitov cheloveka // Sb. dokl. «Dostizheniy i perspektivi razvitiy sovremennoy parazitologii». – Vitebsk: VGMU, 2006. – S. 71–73.
3. *Ilinskih E.N. i dr.* Ekogenetika opistorchoza i persistenciy virusa Epschteyna-Barr. – Tomsk: Izd. Sib. med. un-ta, 2000. – 268 s.
4. *Ilinskih N.N.* Populycionnie issledovaniy citogeneticheskoy patalogii v ochagah opistorhoza v usloviyh Ob-Irtishskogo basseyna // Sb. dokl. «Komplex. gigien. issled. v prakt. zdravoohr». – Novokuzneck, 1981. – S. 481–484.
5. *Ilinskih N.N.* Problema opistorchoza na severe Tymenskoy oblasti v svyzi s ego vliyniem na geneticheskie struktury organizma // Sb. dokl. «Osobennosti patologii u korennogo i prishlogo naseleniy v usloviyh Kraynego Severa». – Krasnoyrsk, 1981. – T. 2. – S. 198.
6. *Kuzhel D.K.* Experimentalnay model opistorhoza na zolotistyh homykah // Mater. X Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. «Agrarnoe proizvodstvo i ochrana prirody». – Vitebsk: VGAVM, 2011. – S. 96–97.
7. *Palcev A.I. i dr.* Patomorfoz opistorhoza // Med. parazitol. i parazit. bol. – 1994. – № 1. – S. 29–33.
8. *Pashinskay E.S. i dr.* Primenenie schelochnogo gel-elektroforeza izolirovannyh kletok v embrionalnyh tkanyh myshey // Mater. 62 nauch. sessii UO «VGMU» «Dostizheniy fundamentalnoy klinicheskoy mediciny i farmacii». – Vitebsk, 2007. – S. 163–166.
9. *Solov'eva A.V.* Hronicheskiy opistorhoz i beremennost. Rukovodstvo dly vrachey. – M.: GEOTAR-Media, 2007. – 130 s.
10. *Ykubovskiy M.V., Skurat E.K.* Opistorhoz: opasnost zarazheniy i profilaktika // Vet. med. Belarusi. – 2008. – № 1–2. – S. 6–11.
11. *Chen L. et al.* Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, № 37. – P. 34329–34335.
12. *Florent M. et al.* Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation // Cell Biol. Toxicol. – 1999. – V. 15. – P. 185–192.
13. *Lundy S.K., Lerman S.P., Boros D.L.* Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL ± T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection // Infection and Immunity. – 2001. –V. 69, № 1. – P. 271–280.
14. *Motorna O.O. et al.* Analysis of lacI mutations in Big Blue® transgenic mice subjected to parasite-induced inflammation // Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen. – 2001. – V. 484. – P. 69–76.

Changes of values obtained in Single Cell Gel Electrophoresis of host somatic cells at experimental opisthorchosis

D.K. Kuzhel
postgraduate
V.J. Bekish
doctor of medical sciences
V.V. Zorina
PhD in biological sciences
Vitebsk State Medical University
Belarus, Vitebsk, 210023, Frunze prosp. 27, e-mail: bekishvl@tut.by

On applying the method of alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) it has been established that metabolites of cat liver fluke maritas have a genotoxic influence on somatic cells of golden hamsters. Genotoxic influence is observed in blood cells of animals on the 7, 14, 21, 28, 35, 60, 90, 120 and 150-th days of invasion with the maximum 8,2 times expression on the 14-th day of invasion. The indicator «the comets tail moment» in bone marrow cells was 1,9–6,5 times higher than the control values with the maximum expression on the 21-st day of invasion. Maximum genotoxic 7,1 times effect in the liver was observed on the 14-th day of invasion. The level of apoptotic cells in blood, bone marrow and liver of animals in experimental opistorchosis increases due to cytotoxic effect of invasion. Cytotoxic effect of metabolites of cat liver fluke maritas is observed in blood on the 7, 14, 21, 28, 35, 60, 90, 120 and 150-th days with the maximum 8,3 times expression of these changes on the 21-st day. In bone marrow the maximum 10,5 times degree of cells apoptosis was observed on the 14 and 28-th days of invasion. The liver cells apoptosis in infected animals 2,3-6,2 times exceeded the control values with the maximum expression of these changes on 28-th day of observation.

Keywords: opistorchosis, method of «DNA-comet assay», golden hamsters, genotoxic and cytotoxic effects.