© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ МАРИТ КОШАЧЬЕГО СОСАЛЬЩИКА НА СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ХОЗЯИНА

КУЖЕЛЬ Д.К., БЕКИШ В.Я., ЗОРИНА В.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра медицинской биологии и общей генетики

Резюме. При применении 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 наблюдается на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й, 60-й, 90-й, 120-й и 150-й дни инвазии с максимальной выраженностью в 8,2 раза на 14-й день инвазии. В клетках костного мозга показатель «момента хвоста комет» в 1,9-6,5 раза превышал контрольные величины с максимальной выраженностью на 21-й день инвазии. В печени максимальный генотоксический эффект в 7,1 раза наблюдался на 14-й день 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 наблюдается на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й, 60-й, 90-й, 120-й и 150-й дни инвазии в крови с максимальной выраженностью этих изменений на 21-й день в 8,3 раза. В костном мозге максимальная степень апоптоза клеток в 10,5 раз наблюдалась на 14-й и 28-й дни инвазии. Апоптоз клеток печени у зараженных животных превышал в 2,3-6,2 раза уровни контроля с максимальной выраженностью этих изменений на 28-й день наблюдения.

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

Abstract. On applying alkaline single cells gel-electrophoresis it has been established that metabolites of catliver fluke maritas exert genotoxic influence on somatic cells of golden hamsters. Genotoxic influence is observed in blood cells of the animals on the 7-th, 14-th, 21-st, 28-th, 35-th, 60-th, 90-th, 120-th and 150-th days of invasion with the maximum 8,2 times expression on the 14-th day of invasion. The indicator of «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 cells of the animals in experimental opisthorchiasis caused by invasion cytotoxic effect increases. Cytotoxic influence of metabolites of catliver fluke maritas is observed in blood on the 7-th, 14-th, 21-st, 28-th, 35-th, 60-th, 90-th, 120-th and 150-th days of invasion 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-th and 28-th days of invasion. The liver cells apoptosis in the infected animals 2,3-6,2 times exceeded the levels of the control values with the maximum expression of these changes on the 28-th day of observation.

Key words: opisthorchiasis, method of «comet DNA», golden hamsters, genotoxic, cytotoxic influences.

Адрес для корреспонденции: *210023, г.Витебск, пр-т Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра медицинской биологии и общей генетики. Тел.моб.: +375 (29) 818-68-61 – Кужель Дмитрий Константинович.*

Согласно данным современной литературы, хронический описторхоз – это системное 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 [1].

Человек может заражаться кошачьим сосальщиком при употреблении в пищу свежей, свежемороженой, вяленой или недостаточно термически обработанной 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 [2].

Несмотря на определённое улучшение санитарного состояния окружающей среды, повышение санитарной грамотности населения, хронический описторхоз остаётся весьма распространённым заболеванием.

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 [3].

Впервые в 1981 году Н.Н. Ильинских [4] показал, что инвазия метацеркариями O. felineus вызывает в клетках костного мозга золотистых хомяков повышение количества клеток с вторичными нарушениями в структуре и числе хромосом. Наиболее значимые цитогенетические изменения отмечались на 60-й и 120-й дни инвазии и 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 авторов, описторхисы могли стать фактором, способным резко усилить мутационные процессы [6].

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 [7]. Наиболее значимые изменения отмечались 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.

Методы

Исследования проводили на 90 золотистых хомяках, которых разделили на две группы (контрольная и опытная) с одинаковым количеством животных в каждой. Контрольной группе вводили внутрижелудочно стерильный 0,9% раствор хлорида натрия в объеме 0,5 мл. Опытную группу разделили на девять подгрупп по 5 животных в каждой, в зависимости от срока забоя. Всем подгруппам животных вводили внутрижелудочно жизнеспособных метацеркариев O. felineus из расчета 2 на 1 г массы тела животного по разработанному нами методу [8]. Исследования проводили на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й, 60-й, 90-й, 120-й и 150-й дни от заражения. На все сроки наблюдения хомяков умерщвляли путем декапитации под эфирным наркозом. Выделяли печень, бедренные кости. Забор периферической крови из сонной артерии производили при помощи вакутайнеров фирмы Monovette с Li-Heparin LH. Кле-

точные суспензии костного мозга, печени получали по разработанному методу [9, 10].

Щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод «ДНК-комет») проводили по N.P. Singh et al. в нашей модификации [9]. Метод «ДНК-комет» позволяет определить уровни одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов молекулы ДНК при воздействии генотоксических факторов окружающей среды и уровни апоптоза клеток. Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле ДНК, возможных фрагментов ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени поврежденности исследуемой ДНК. Метод позволяет определять уровень первично-апоптотических клеток, имеющих минимальные размеры ядра и большой «хвост кометы» [11]. 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 учитывался 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 сравнивались с показателями контрольной группы.

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

Результаты

Полученные методом «ДНК-комет» результаты при экспериментальном описторхозе в контрольных и опытных группах представлены в таблицах 1–3.

При исследовании клеток крови у зараженных хомяков на 7-й день наблюдений было установлено, что длина «хвостов комет» (в пикселях) в 2,5 раза была выше контроля, а процент поврежденной ДНК в «хвостах комет» – в 3,1 раза превышал контрольный уровень (табл. 1). Показатель «момента хвоста комет» достоверно превышал контрольный показатель в 7,3 раза. Процент апоптотических клеток был выше контроля в 2,6 раза. На 14-й день наблюдения показатель длины «хвостов комет» достоверно не изменялся, а процент поврежденной ДНК в «хвостах комет» достоверно возрос в 2,8 раза по отношению к контролю. Основные показатели генотоксичности («момент хвоста» комет) и цитотоксичности (процент апоптотических клеток) в 8,2 и 3,8 раза соответственно достоверно превышали контрольные данные. На 21-й день наблюдения показатели длины «хвостов комет» (в пикселях) и процента поврежденной ДНК в «хвостах комет» возросли в 1,2 и 1,8 раза соответственно по отношению к контролю. Показатель «момента хвоста комет» превысил контрольный показатель в 2,7 раза, а процент апоптотических клеток достоверно увеличился в 8,3 раза по отношению к контролю. На 28-й день наблюдения в клетках периферической крови показатель длины «хвостов комет» достоверно превышал контрольный показатель в 2 раза, а процент поврежденной ДНК в «хвостах комет» достоверно не изменялся. «Момент хвоста комет» и процент апоптотических клеток достоверно возрастали в 3 и 3,8 раза соответственно по сравнению с контрольными величинами. На 35-й день наблюдения длина «хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» достоверно были выше в 2,7 и 2,6 раза соответственно по отношению к контролю. Момент хвоста комет достоверно возрос в 5,1 раза, а процент апоптотических клеток – в 2,5 раза по отношению к контрольным показателям. На 60-й день наблюдения показатели генотоксичности (длина «хвостов комет» и про-

Таблица 1

Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток при описторхозе в крови золотистых хомяков (M+SD)

Группа исследования		Исследуемый показатель			
		Длина «хвостов комет» (в пикселях)	% ДНК в «хвостах комет»	«Момент хвоста комет»	% апоптотических клеток
7 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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.

цент ДНК в «хвостах комет») достоверно возросли в 1,3 и 2,4 раза соответственно. «Момент хвоста комет» достоверно возрос в 6,6 раза, а процент апоптотических клеток снизился в 2 раза по сравнению с контрольными величинами. При наблюдении на 90-й день было установлено, что показатель «длины хвостов комет» достоверно возрос в 2,26 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» – в 2,37 раза превысили контрольные показатели. Основной показатель генотоксичности достоверно превысил контрольный показатель в 6,3 раза, а цитотоксичности – в 7 раз. На 120-й день наблюдения в клетках периферической крови показатель длины «хвостов комет» достоверно превышал контрольный показатель в 2,3 раза, а процент поврежденной ДНК в «хвостах комет» в 2,6 раза. Показатель «момента хвоста комет» превысил контрольный показатель в 8,1 раза, а процент апоптотических клеток достоверно увеличился в 2 раза по отношению к контрольным показателям. На последний срок наблюдения также наблюдались достоверные изменения по всем исследуемым показателям. Так, показатель длины «хвостов комет» возрос достоверно в 2,6 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» возрос в 2,1 раза. Основной показатель генотоксичности возрос в 5 раз, а цитотоксичности – в 4,5 раза.

Исследование клеток костного мозга у хомяков также выявило достоверные из-

Таблица 2

Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток при описторхозе в костном мозге золотистых хомяков (M+SD)

Группа исследования		Исследуемый показатель			
		Длина «хвостов комет» (в пикселях)	% ДНК в «хвостах комет»	«Момент хвоста комет	% апоптотических клеток
7 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 P<0,01-0,05.

менения на всех сроках наблюдения (табл. 2). Так, на 7-й день наблюдения длина «хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» достоверно были выше в 2,9 и 6,3 раз соответственно по отношению к контролю. Основные показатели генотоксичности и цитотоксичности возрастали по отношению к контрольным показателям в 1,9 и 9 раз соответственно. На 14-й день наблюдения показатель длины «хвостов комет» достоверно не изменялся, а процент ДНК в «хвостах комет» достоверно увеличился в 2 раза. Показатель «момента хвоста» превысил в 5,3 раза данные контроля, а процент апоптотических клеток в 10,5 раз был выше контрольного показателя. К 21-му дню наблюдений в клетках костного мозга длина «хвостов комет» превышала показатель контроля в 1,8 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» достоверно возрос в 2,9 раза. Основной показатель генотоксичности увеличился в 6,5 раз, а показатель цитотоксичности – в 5,3 раза по отношению к контрольным уровням. На 28-й день инвазии показатель длины «хвостов комет» был выше данных контроля в 1,5 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» – в 1,9 раз контрольного уровня. Основные показатели гено- и цитотоксичности достоверно возросли в 5,5 и 10,5

раза соответственно по отношению к контрольным величинам. На 35-й день наблюдения в клетках костного мозга все показатели достоверно изменялись. Так, длина «хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» достоверно были выше в 1,9 и 2,5 раза соответственно по отношению к контролю. Показатель «момента хвоста» превысил в 7,8 раза данные контроля, а процент апоптотических клеток в 7,3 раз был выше контрольного показателя. На 60-й день наблюдения в клетках костного мозга длина «хвостов комет» превышала показатель контроля в 1,4 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» достоверно возрос в 3,5 раза. Основные показатели генотоксичности и цитотоксичности возрастали по отношению к контрольным показателям в 14,4 и 12,5 раза соответственно. На 90-й день наблюдения длина «хвостов комет» превышала показатель контроля в 2,5 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» достоверно возрос в 3,1 раза по отношению к контрольным величинам. Основные показатели гено- и цитотоксичности достоверно возросли в 12,5 и 24 раза соответственно. На 120-й день наблюдения показатели генотоксичности (длина «хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет») достоверно возросли в 2,9 и 3,1 раза соответственно. Основные показатели генотоксичности и цитотоксичности возрастали по отношению к контрольным показателям в 13,2 и 3,8 раза соответственно. На последний срок наблюдения (150-й день), все исследуемые показатели достоверно изменялись и возрастали. Показатель длины «хвостов комет» был выше данных контроля в 2 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» – в 3,2 раза контрольного уровня. Основные показатели гено- и цитотоксичности достоверно возросли в 5,6 и 5,25 раз соответственно по отношению к контрольным величинам.

В клетках печени у зараженных золотистых хомяков на 7-й день наблюдения показатели длины «хвостов комет» и процента ДНК в «хвостах комет» увеличились по сравнению с данными контроля в 1,6 и 2 раза соответственно (табл. 3). Показатель «момента хвоста комет» возрос в 4,7 раза по отношению к контролю, а процент апоптотических клеток в 3,7 раза превышал контрольные величины. На 14-й день наблюдения показатель длины «хвостов комет» превысил уровень контроля в 2,7 раза, процент ДНК в «хвостах комет» достоверно возрос в 3,6 раз по отношению к данным интактных животных. Показатель «момента хвоста» и процент апоптотических клеток достоверно увеличились в 7,1 и 2,3 раза соответственно в сравнении с контрольными показателями. На 21-й день инвазии в клетках печени золотистых хомяков длина «хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» превышали в 1,9 и 1,8 раза соответственно данные контроля. Основные показатели гено- и цитотоксичности в 3,5 и 5,9 раза соответственно были выше чем у интактных животных. К 28-му дню наблюдений показатель длины «хвостов комет» достоверно не изменился, а процент ДНК в «хвостах комет» возрос в 2,5 раза по отношению к контрольным данным. Основные показатели генотоксичности и цитотоксичности были больше в 5,6 и 6,2 раза соответственно по отношению к контрольным величинам. На 35-й день наблюдения все исследуемые показатели достоверно изменялись. Так, показатели длины «хвостов комет» и процента ДНК в «хвостах комет» увеличились по сравнению с данными контроля в 1,3 и 2,2 раза соответственно. Показатель «момента хвоста комет» возрос в 2,9 раза по отношению к контролю, а процент апоптотических клеток в 3,6 раза превышал контрольные величины. На 60-й день наблюдения показатель длины «хвостов комет» превысил уровень контроля в 2,2 раза, процент ДНК в «хвостах комет» достоверно возрос в 1,4 раза по отношению к данным интактных животных. Показатель «момента хвоста» и процент апоптотических клеток достоверно увеличились в 3 и 3,7 раза соответственно в сравнении с контрольными показателями. На 90-й день наблюдения в клетках печени золотистых хомяков длина «хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» превышали в 1,8 и

Таблица 3

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

Группа исследования		Исследуемый показатель			
		Длина «хвостов комет» (в пикселях)	% ДНК в «хвостах комет»	«Момент хвоста комет»	% апоптотических клеток
7 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 день	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 P<0,01-0,05.

1,5 раза соответственно данные контроля. Основные показатели гено- и цитотоксичности в 2,9 и 4,5 раза соответственно были выше, чем у интактных животных. На 120-й день наблюдения все исследуемые показатели достоверно изменялись и возрастали. Показатель длины «хвостов комет» был выше данных контроля в 1,9 раза, а процент ДНК в «хвостах комет» – в 1,4 раза контрольного уровня. Основные показатели гено- и цитотоксичности достоверно возросли в 3 и 4,1 раза соответственно по отношению к контрольным величинам. На 150-й день наблюдения все исследуемые показатели также достоверно возрастали. Так, показатели длины «хвостов комет» и процента ДНК в «хвостах комет» увеличились по сравнению с данными контроля в 1,2 и 1,4 раза соответственно. Основные показатели гено- и цитотоксичности в 1,9 и 3,6 раза соответственно были выше, чем у интактных животных.

Обсуждение

Таким образом, было установлено, что мариты кошачьего сосальщика обладают генотоксическим и цитотоксическим воздействиями на соматические клетки организма хозяина на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й, 60-й, 90-й, 120-й и 150-й дни от заражения, которое характеризуется увеличением количества одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК, апоптоза в клетках крови, костного мозга и печени in vivo. Рост уровня первичных

повреждений ДНК в клетках хозяина был обусловлен повышением числа мелких разрывов ДНК (рост «длины хвостов комет»), процента поврежденной ДНК, основного показателя генотоксичности – «момента хвоста», а также основного показателя цитотоксичности – процент апоптотических клеток.

В клетках крови «длина хвостов комет» при инвазии достоверно повышалась в среднем в 1,2-2,7 раза с максимальными значениями на 7-й, 21-й и 28-й дни инвазии, а процент ДНК в «хвостах комет» в 1,8-3,1 раза с наибольшими показателями на 7-й, 14-й, 21-й дни наблюдения. Основной показатель генотоксичности возрастал в 2,7-8,2 раза, 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 1,9-14,4 раза, а процент апоптотических клеток в 5,2-24 раза.

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 раза, а цитотоксичности – в 2,3-6,2 раза.

Наиболее выраженные генотоксические эффекты во всех исследуемых типах клеток наблюдались на 7-й, 14-й и 28-й дни наблюдения, а цитотоксический эффект – на 21-й и 28-й дни 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 фаза заболевания, которая затем перешла в хроническую. Суммарно генотоксический и цитотоксический эффекты инвазии кошачьими сосальщиками 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-й, 21-й и 28-й дни инвазии, а процент ДНК в «хвостах комет» в 1,8-3,1 раза на 7-й, 14-й, 21-й дни наблюдения. Основной показатель генотоксичности возрастал в 2,7-8,2 раза, 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 раза, а процент апоптотических клеток в 5,3-10,5 раза. 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 раза, а цитотоксичности – в 2,3-6,2 раза.

Полученные нами 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. [12] была изучена способность метаболитов Fasciola hepatica вызывать генные мутации в соматических клетках инвазированных млекопитающих. Исследования были проведены на трансгенных мышах-самцах линии C57BL/6 Big Blue®, которых заражали в дозе 2 метацеркария печеночного сосальщика на особь. К 15-му дню 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%) (11, 13). S.K. Lundy et al. [13] изучили апоптоз CD4+ T лимфоцитов в течение шистосомозной инвазии у мышей-самок линии CBA/Jk. Животных заражали в дозе 25 церкариев Schistosoma mansoni и иссле-

довали ранний апопотоз Т-лимфоцитов селезенки и клеток шистососмозных гранулем. Авторы показали, что в течение созревания личинок (4 недели после заражения) апоптоз в селезеночных CD4+ Т-лимфоцитах не повышался, но многократно возрастал к 6-ой неделе инвазии и коррелировал с временем попадания яиц в печень [13]. L. Chen et al. [14] 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 [14].

Заключение

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

2. 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 наблюдается на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й, 60-й, 90-й, 120-й и 150-й дни инвазии в крови с максимальной выраженностью этих изменений на 21-й день в 8,3 раза. В костном мозге максимальная степень апоптоза клеток в 10,5 раза наблюдалась на 14-й и 28-й дни инвазии. Апоптоз клеток печени у зараженных животных превышал в 2,3-6,2 раза уровни контроля с максимальной выраженностью этих изменений на 28-й день наблюдения.

Литература

1. Пальцев, А.И. Патоморфоз описторхоза / А.И. Пальцев [и др.] // Мед. паразитолог. – 1994. – №1. – С. 29 – 33.
2. Соловьёва, А.В. Хронический описторхоз и беременность: Руководство для врачей / А.В. Соловьёва. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2007. – 130 с.
3. Якубовский, М.В. Описторхоз: опасность заражения и профилактика / М.В. Якубовский, Э.К. Скурат // Вет. медицина Беларуси. – 2008. – № 1 – 2. – С. 6 – 11.
4. Ильинских, Н.Н. Популяционные исследования цитогенетической патологии в очагах описторхоза в условиях Обь-Иртышского бассейна / Н.Н. Ильинских // Комплекс. гигиен. исслед. в практ. здравоохр. – Новокузнецк, 1981. – С. 481 – 484.
5. Ильинских, Н.Н. Проблема описторхоза на севере Тюменской области в связи с его влиянием на генетические структуры организма / Н.Н. Ильинских // Особенности патолог. у коренного и пришлого населения в условиях Крайнего Севера. – Красноярск, 1981. – Т. 2. – С. 198.
6. Экогенетика описторхоза и персистенция вируса Эпштейна-Барр / Е.Н. Ильинских [и др.]. – Томск: Изд. Сиб. мед. ун-та, 2000.– 268 с.
7. Ильинских, Е.Н. Влияние ассоциации трематод Opisthorchis felineus и потенциально онкогенного вируса Эпштейна-Барр на уровень цитогенетических поражений Т-лимфоцитов человека / Е.Н. Ильинских, Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских // Достижения и перспективы развития соврем. паразитолог. – Витебск: ВГМУ. – 2006. – С. 71 – 73.
8. Кужель, Д.К. Экспериментальная модель описторхоза на золотистых хомяках / Д.К. Кужель // Исслед. молодых учёных: материалы X Междунар. науч. – практ. конф. «Аграрное производство и охрана природы», Витебск, 26 – 27 мая 2011г., под ред. Ятусевича А.И. – Витебск: ВГАВМ. – 2011. – С. 96 – 97.
9. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений : метод. рекомендации / А.Д. Дурнев [и др.] ; утв. РАМН и РАСН. – М., 2006. – 27 с.
10. Применение щелочного гель-электрофореза

изолированных клеток в эмбриональных тканях мышей / Е.С. Пашинская [и др.] // Достижения фундам., клин. медицины и фармации: материалы 62 научн. сессии УО «ВГМУ», Витебск, 22-23 марта 2007 г. / Витебск. гос. мед. ун-т; редкол.: В.П. Дейкало [и др.]. – Витебск, 2007. – С. 163-166.
11. Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation / M. Florent [et al.] // Cell Biol. Toxicol. – 1999. – Vol. 15. – P. 185–192.
12. Analysis of lacI mutations in Big Blue® transgenic mice subjected to parasite-induced inflammation. / O.O. Motorna [et al.] // Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen. – 2001. – Vol. 484. – P. 69–76.
13. Lundy, S. K. 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 / S.K. Lundy, S.P. Lerman, D.L. Boros // Infection and Immunity. – Vol. 69, № 1. – 2001. – P. 271–280.
14. Skin-stage schistosomula of Schistosoma mansoni produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells / L. Chen [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, Is. 37. – P. 34329–34335.

Поступила 29.08.2013 г.
Принята в печать 05.09.2013 г.

Сведения об авторах:
Кужель Д.К. – аспирант кафедры медицинской биологии и общей генетики УО «ВГМУ»;
Бекиш В.Я. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой медицинской биологии и общей генетики УО «ВГМУ»;
Зорина В.В. – к.б.н., доцент кафедры медицинской биологии и общей генетики, УО «ВГМУ».