

УДК 616-002.95:575

В. В. ЗОРИНА, В. Я. БЕКИШ

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ПАТОГЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ *DIPHYLLOBOOTHRIUM LATUM* (LINNAEUS, 1758) НА ОРГАНИЗМ ХОЗЯИНА

Витебский государственный медицинский университет, Беларусь, e-mail: verazorina@tut.by

(Поступила в редакцию 02.04.2015)

Введение. Дифиллоботриоз – заболевание, для которого характерно нарушение функций верхнего отдела желудочно-кишечного тракта, а при тяжелом течении – развитие В₁₂-дефицитной анемии. Возбудитель дифиллоботриоза – широкий лентец (*Diphyllobothrium latum*), наиболее крупный из паразитирующих в организме человека гельминтов (стробила его может достигать в длину до 10–20 м). Заражение человека происходит при употреблении в пищу инвазированной плероцеркоидами сырой или полусырой (вяленой) рыбы, а также свежепосоленной икры. Через 14–30 дней паразит достигает половозрелой стадии развития и начинает откладывать яйца. Весь цикл развития гельминта занимает 15–25 недель. В кишечнике человека паразитирует обычно одна, иногда несколько особей лентеца широкого. Продолжительность жизни широкого лентеца может достигать 20 лет и более.

Ранее нами было показано, что инвазии цестодами (свиной, бычий, карликовый цепни) характеризуются ростом количества одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК, апоптотических соматических и генеративных клеток мышевидных грызунов [4]. Трехкратная подкожная сенсibilизация белковыми соматическими продуктами из тканей *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) или *Taeniarinchus saginatus* (Goeze, 1782) сопровождается генотоксическими и цитотоксическими эффектами в соматических клетках костного мозга и в генеративных клетках семенников мышей [5]. Первичные повреждения ДНК, апоптоз клеток мышевидных грызунов при дифиллоботриозе, а также развитие окислительного стресса как возможные причины этих эффектов в тканях инвазированного хозяина ранее не исследовались.

Цель работы – изучить возможные генотоксические и цитотоксические эффекты в клетках хозяина при дифиллоботриозе и сенсibilизации белковым соматическим продуктом (БСП) из тканей широкого лентеца, а также развитие окислительного стресса в тканях инвазированного организма.

Объекты и методы исследования. Экспериментальные исследования были проведены в двух сериях опытов на 20 золотистых хомяках-самцах массой 45–60 г, 40 мышах-самцах линии СВА массой 18–20 г.

В первой серии опытов определяли наличие возможных генотоксических и цитотоксических эффектов в геноме млекопитающих и развитие окислительного стресса при паразитировании широкого лентеца. Золотистые хомяки-самцы были разделены на две группы, по 10 животных в каждой. Первая группа была контрольной, вторая – инвазирована *D. latum*. Золотистым хомякам контрольной группы перорально вводили по 1 мл 2 %-ного крахмального геля, каждое животное второй группы заражали 10 плероцеркоидами широкого лентеца [1], выделенными из мяса инвазированных рыб. Для улучшения приживляемости широких лентецов и их более длительного

паразитирования проводили обработку дексаметазоном, который вводили подкожно в дозе 0,4 мг на животное за 2 дня до заражения и далее 2 раза в неделю после заражения [1]. У золотистых хомяков обеих групп осуществляли щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод «ДНК-комет») костного мозга и семенников на 20-й день от начала опыта, а также определяли концентрации продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК), общую антиоксидантную активность (АОА), активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в печени и семенниках животных. Метод «ДНК-комет» клеток костного мозга и семенников проводили в нашей модификации [7]. Повреждения ядерной молекулы ДНК определяли при помощи автоматической программы CASP v.1.2.2 [10]. В качестве основного показателя генотоксического воздействия факторов среды при применении метода «ДНК-комет» использовали международно принятый показатель «момент хвоста» («длина хвоста», умноженная программой на процент ДНК в «хвосте кометы»). Для оценки цитотоксического воздействия в 100 случайно выбранных клетках определяли процент апоптотических, отличающихся минимальным размером ядра и большим, широко раскинутым хвостом. Свободнорадикальные процессы у животных в процессе инвазии оценивали по изменению уровней МДА, ДК, АОА, активности СОД и каталазы в гомогенатах печени и семенников с применением стандартных спектрофотометрических методов [2, 6, 8, 9, 11]. Интенсивность инвазии определяли путем подсчета паразитов в кишечнике при вскрытии животных.

Во второй серии опытов изучали влияние сенсibilизации БСП из тканей широкого лентеца на состояние генома хозяина. Мыши-самцы линии СВА были разделены на две группы. Первая группа – контрольная, включала 10 мышей, а вторая, сенсibilизированная БСП *D. latum*, – 30. Мышам контрольной группы во внутреннюю поверхность бедра трехкратно подкожно вводили по 0,2 мл стерильного 0,9 %-ного раствора хлорида натрия. Вторая группа состояла из трех подгрупп по 10 животных, которым во внутреннюю поверхность бедра трехкратно подкожно вводили БСП *D. latum* из расчета 200, 400 или 800 мкг/г массы тела животного соответственно. БСП из целых половозрелых широких лентецов получали по разработанному нами методу [3]. Учет изменений в костном мозге и семенниках после применения метода «ДНК-комет» проводили у животных на 4-й день от первого введения паразитарного продукта или 0,9 %-ного раствора хлорида натрия [7].

Для статистической обработки полученных цифровых данных использовали программу Excel 2010. Рассчитывали среднюю арифметическую, ошибку средней арифметической ($M \pm m$), а в опытах с применением метода «ДНК-комет» – стандартное отклонение средней арифметической ($M \pm SD$). Достоверность выявляемых различий определяли по *t*-критерию Стьюдента. Полученные результаты считали достоверными при $P < 0,01-0,05$.

Результаты и их обсуждение. При применении метода «ДНК-комет» в клетках костного мозга золотистых хомяков группы интактного контроля показатель «длины хвостов» комет составил $4,10 \pm 0,89$ пикселя, процент ДНК в «хвостах комет» – $1,78 \pm 0,55$, показатель «момент хвоста» – $0,08 \pm 0,04$, а апоптотические клетки – $2,80 \pm 0,35$ %. В клетках семенников контрольных животных «длина хвостов» комет и процент ДНК в «хвостах комет» составили $7,92 \pm 1,56$ и $1,85 \pm 0,77$ соответственно. Показатель «момент хвоста» составил $0,16 \pm 0,09$, а процент апоптотических клеток – $3,40 \pm 0,90$.

У зараженных *D. latum* золотистых хомяков на 20-й день наблюдения в клетках костного мозга длина «хвостов комет» составила $15,34 \pm 2,18$ пикселя, что достоверно превысило контрольный показатель в 3,7 раза (табл. 1). Процент ДНК в «хвостах комет» и показатель «момент хвоста» в клетках костного мозга были выше в 4 и 13,6 раза по сравнению с контрольными уровнями. Процент апоптотических клеток не отличался от данных интактного контроля. Все показатели генотоксичности и основной показатель цитотоксичности в клетках семенников не отличались от таковых у животных негативного контроля (табл. 1). Количество половозрелых паразитов в тонком кишечнике составило $2,8 \pm 0,5$ экземпляра.

При применении метода «ДНК-комет» клетки костного мозга и семенников при сенсibilизации БСП из тканей широкого лентеца у мышей-самцов линии СВА определяли на 4-й день с момента его первого введения. В клетках костного мозга контрольных животных во время опыта

Т а б л и ц а 1. Изменение показателей в клетках костного мозга и семенников золотистых хомяков при дифиллоботриозе после применения метода «ДНК-комет»

Группа	Объект исследований	Длина «хвостов комет» (в пикселях)	Процент ДНК в «хвостах комет»	«Момент хвоста»	Процент апоптотических клетки
Негативный контроль	Костный мозг	4,10 ± 0,89	1,78 ± 0,55	0,08 ± 0,04	2,80 ± 0,35
Инвазия		15,34 ± 2,18*	7,10 ± 1,36*	1,09 ± 0,56*	2,60 ± 0,58
Негативный контроль	Семенники	7,92 ± 1,56	1,85 ± 0,77	0,16 ± 0,09	3,40 ± 0,90
Инвазия		7,92 ± 0,86	1,84 ± 0,69	0,18 ± 0,06	3,40 ± 0,34

Пр и м е ч а н и е. * – достоверное отличие от данных негативного контроля при $P < 0,01-0,05$.

Т а б л и ц а 2. Изменение показателей в клетках костного мозга и семенников мышей-самцов линии СВА при трехкратной подкожной сенсибилизации БСП из тканей *D. latum* после применения метода «ДНК-комет»

Объект исследований	Введенная доза, мкг/г	Процент ДНК в «хвостах комет»	Длина «хвостов комет» (в пикселях)	«Момент хвоста»	Процент апоптотических клеток
Костный мозг	Негативный контроль	0,82 ± 0,12	5,25 ± 0,33	0,06 ± 0,02	0,20 ± 0,32
	200	1,02 ± 0,23	5,13 ± 0,26	0,10 ± 0,02	0,40 ± 0,52
	400	1,03 ± 0,12	5,92 ± 1,51	0,12 ± 0,06	0,90 ± 1,15
	800	2,41 ± 0,77*	8,11 ± 0,21*	0,29 ± 0,06*	2,40 ± 0,32*
Семенники	Негативный контроль	3,39 ± 1,10	6,96 ± 0,98	0,27 ± 0,08	2,30 ± 0,48
	200	3,45 ± 1,45	8,65 ± 2,86	0,29 ± 0,24	1,80 ± 1,75
	400	3,77 ± 1,98	11,28 ± 3,78	0,36 ± 0,18	2,00 ± 0,87
	800	7,16 ± 0,99*	16,88 ± 2,27*	1,12 ± 0,19*	4,60 ± 1,16*

Пр и м е ч а н и е. * – достоверное отличие от данных негативного контроля при $P < 0,01-0,05$.

показатель «длины хвостов» комет составил $5,25 \pm 0,33$ пикселя, процент ДНК в «хвостах комет» – $0,82 \pm 0,12$, показатель «момент хвоста» – $0,06 \pm 0,02$, процент апоптотических клеток – $0,20 \pm 0,32$ (табл. 2). В клетках семенников контрольных животных «длина хвостов» комет и процент ДНК в «хвостах комет» составили $6,96 \pm 0,98$ пикселя и $3,39 \pm 1,10$ % соответственно. Показатель «момент хвоста» составил $0,27 \pm 0,08$, а процент апоптотических клеток – $2,30 \pm 0,48$.

При применении метода «ДНК-комет» в клетках костного мозга у сенсибилизированных БСП из тканей *D. latum* в дозе 200 и 400 мкг/г массы тела животных все показатели генотоксичности и цитотоксичности достоверно не превышали контрольный уровень (табл. 2). При повышении дозы БСП из тканей *D. latum* до 800 мкг/г в костном мозге наблюдалось повышение показателя «длины хвостов» комет и процента ДНК в «хвостах комет» в 1,5 и 2,9 раза соответственно по отношению к контрольным показателям. Показатель «момент хвоста» клеток костного мозга у сенсибилизированных животных был в 4,8 раза выше по отношению к контролю. Процент апоптотических клеток в 12 раз превышал уровень негативного контроля.

В семенниках у сенсибилизированных БСП из тканей *D. latum* в дозе 200 и 400 мкг/г массы тела животных «длина хвостов» комет, процент ДНК в «хвостах комет», «момент хвоста» и процент апоптотических клеток достоверно не превышали контрольные уровни (табл. 2). При повышении дозы БСП из тканей *D. latum* до 800 мкг/г в семенниках наблюдалось повышение показателя «длины хвостов комет» и процента ДНК в «хвостах комет» в 2,4 и 2,1 раза соответственно по отношению к контрольным показателям. Показатель «момент хвоста» клеток костного мозга у сенсибилизированных животных был выше в 4,5 раза по отношению к контролю. Процент апоптотических клеток в 2 раза превышал уровень негативного контроля (табл. 2).

Воздействие дифиллоботриозной инвазии на изменения концентраций продуктов ПОЛ, АОА и активности СОД и каталазы изучали в гомогенатах печени и семенников зараженных золотистых хомяков. Исследования проводили у интактных и зараженных животных.

В печени контрольной группы золотистых хомяков концентрации продуктов ПОЛ составили: для ДК – $237,9 \pm 60,2$ нМ/г липидов, для МДА – $303,1 \pm 27,0$ нМ/г белков. АОА была $29,1 \pm 7,2$ %, активность каталазы и СОД – $2,1 \pm 0,2$ мкМ/г ткани и $84,2 \pm 37,8$ Ед/г ткани-мин соответственно (табл. 3).

В клетках печени животных, зараженных дифиллоботриями в дозе 10 плероцеркоидов на одно животное, на 20-й день инвазии концентрации ДК и МДА повысились в 1,2 и 1,3 раза соответственно, АОА уменьшилась в 1,7 раза по сравнению с контролем (табл. 3). Активность каталазы была ниже в 2,6 раза, а показатель СОД – в 2,5 раза.

В семенниках хомяков контрольной группы концентрации продуктов ПОЛ составили: для ДК – $572,7 \pm 77,5$ нМ/г липидов, для МДА – $1228,4 \pm 195,7$ нМ/г белков. АОА была $20,6 \pm 2,8$ %, активность каталазы и СОД – $0,9 \pm 0,3$ мкМ/г ткани и $93,5 \pm 6,4$ Ед/г ткани-мин соответственно (табл. 3).

В семенниках инвазированных животных на 20-й день после заражения концентрация ДК была выше в 1,3 раза, уровень МДА был выше в 1,9 раза, а процент АОА – в 1,4 раза ниже по сравнению с контролем (табл. 3). Активность каталазы была ниже в 1,5 раза, а показатель СОД – в 2,2 раза по отношению к контрольным показателям.

Т а б л и ц а 3. Концентрации ДК, МДА, АОА, активность каталазы и СОД в печени и семенниках золотистых хомяков при дифиллоботриозе

Группа	Объект исследований	ДК, нМ/г липидов	МДА, нМ/г белка	АОА, %	Каталаза, мкМ/лг ткани-мин	СОД, Ед/г ткани-мин
Контрольная	Печень	$237,9 \pm 60,2$	$303,1 \pm 27,0$	$29,1 \pm 7,2$	$2,1 \pm 0,2$	$84,2 \pm 37,8$
	Семенники	$572,7 \pm 77,5$	$1228,4 \pm 195,7$	$20,6 \pm 2,8$	$0,9 \pm 0,3$	$93,5 \pm 6,4$
Животные на 20-й день инвазии	Печень	$289,5 \pm 17,9^*$	$388,7 \pm 10,9^*$	$17,2 \pm 7,1^*$	$0,8 \pm 0,2^*$	$34,3 \pm 6,8^*$
	Семенники	$735,0 \pm 19,8^*$	$2361,8 \pm 86,6^*$	$14,7 \pm 3,1^*$	$0,6 \pm 0,2^*$	$42,3 \pm 15,7^*$

П р и м е ч а н и е. * – достоверное отличие от данных контрольной группы при $P < 0,01-0,05$. ДК – диеновые конъюгаты, МДА – малоновый диальдегид, АОА – антиоксидантная активность, СОД – супероксиддисмутаза.

Таким образом, при изучении состояния генома хозяина при дифиллоботриозе у золотистых хомяков на имагинальной стадии развития широкого лентеца установлено, что метаболиты *D. latum* обладают генотоксическим воздействием на соматические клетки инвазированного хозяина, вызывая увеличение *in vivo* количества одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК в костном мозге до 7,1 %. Полученные данные совпадают с результатами наших исследований, проведенных ранее при экспериментальных цестодозах – гименолепидозе, тениозе и тениаринхозе [4].

Трехкратная подкожная сенсibilизация БСП из тканей *D. latum* в дозах 200 и 400 мкг/г не сопровождается генотоксическим и цитотоксическим эффектами в соматических клетках костного мозга и генеративных клетках семенников мышей. Увеличение дозы БСП из тканей *D. latum* до 800 мкг/г характеризуется достоверным ростом в костном мозге и семенниках животных одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК клеток до 2,41–7,16 %, апоптотических клеток – до 2,40–4,60 %.

Установлено, что инвазия широкими лентецами у золотистых хомяков сопровождается нарушением хода свободнорадикальных процессов в клетках семенников хозяина. На 20-й день после заражения широкими лентецами в дозе 10 плероцеркоидов на животное повышаются концентрации продуктов ПОЛ (ДК, МДА) и снижаются АОА, а также активность ферментов антиоксидантов – каталазы, СОД. Изменения свободнорадикальных процессов коррелируют с цитогенетическими изменениями в клетках костного мозга.

Выводы

1. Инвазия широкими лентецами золотистых хомяков сопровождается в соматических клетках хозяина генотоксическим эффектом, который характеризуется ростом количества одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК клеток костного мозга до 7,1 %.

2. Трехкратная подкожная сенсibilизация БСП из тканей *D. latum* в дозе 800 мкг/г характеризуется генотоксическим и цитотоксическим эффектами в соматических клетках костного мозга и генеративных клетках семенников мышей линии СВА, которые проявляются ростом одноце-

почечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК до 2,41–7,16 %, апоптотических клеток – до 2,40–4,60 %.

3. Дифиллоботриозная инвазия в клетках печени и семенников хозяина сопровождается окислительным стрессом, который характеризуется увеличением концентраций продуктов ПОЛ (МДА, ДК), снижением активности ферментов-антиоксидантов (СОД, каталазы), общей антиоксидантной активности и коррелирует с ростом цитогенетических повреждений клеток костного мозга.

Литература

1. Астафьев Б. А., Яроцкий Л. С., Лебедева М. Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. М.: Наука, 1989.
2. Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А. // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.
3. Бекиш В. Я. // Здравоохранение. 1999. № 6. С. 17–19.
4. Бекиш О.-Я. Л., Бекиш В. Я. Цестодозы человека. Витебск: ВГМУ, 2008.
5. Бекиш В. Я., Бекиш О.-Я. Л., Поляржин В. В. и др. // Клін. та експерим. патологія. 2007. Т. VI, № 4. С. 10–15.
6. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Хмара Н. Ф. // Лаб. дело. 1988. № 2. С. 60–63.
7. Дурнев А. Д., Бекиш В. Я. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. М., 2006.
8. Клебанов Г. И. и др. // Лаб. дело. 1988. № 5. С. 59–62.
9. Короток М. А. и др. // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–18.
10. Kořca K. et al. // Mutat. Res. Genetic Toxicol. and Envir. Mutagenesis. 2003. Vol. 534. P. 15–20.
11. Beauchamp C., Fridovich J. // Analyt. Biochem. 1971. Vol. 44, N 1. P. 276–287.

V. V. ZORYNA, U. J. BEKISH

GENOTOXIC AND CYTOTOXIC PATHOGENIC INFLUENCE OF *DIPHYLLOBOTHRIUM LATUM* (LINNAEUS, 1758) ON HOST ORGANISM

Summary

Diphyllobothriosis of hamsters is going with genotoxic effect in somatic cells of host which characterized by growth number of single cell breaks, alkali-labile sites nucleus molecule DNA of bone marrow cells till 7.1 %. Underskin three-times sensibilization by PSP from *D. latum* tissues in dose of 800 mcg/g is characterized by genotoxic and cytotoxic effects in somatic cells of bone marrow and generative cells of testicals of CBA line mice which appears by growth of number of single cell breaks, alkali-labile sites nucleus molecule DNA to 2.41–7.16 % and apoptotic cells to 2.40–4.60 %. Invasion by dyphyllobothriosis is going with oxidative stress in hepatic cells and testicals of host, which characterized by growth of concentration of products POL (MDA, DK) lower levels of ferments-antioxidates activity (SOD, catalase) common antioxydative activity and correlates with growth of cytogenetic damages of bone marrow cells.