

УДК 619:616.995.132.8:092

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИГРАЦИИ ЛИЧИНОК *ASCARIS SUUM* НА КЛЕТКИ ХОЗЯИНА

В.Я. БЕКИШ

доктор медицинских наук

В.В. ЗОРИНА

ассистент

О.-Я.Л. БЕКИШ

доктор биологических наук

*Витебский государственный медицинский университет,
Республика Беларусь*

(Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе д. 27,
e-mail: bekishvl@tut.by)

Метаболиты мигрирующих личинок *Ascaris suum* обладают генотоксическим воздействием на соматические и генеративные клетки хозяина, вызывая увеличение одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной молекулы ДНК на 0,98–8,08 % в костном мозге и на 5,51–14,92 % – в семенниках инвазированных животных. Генотоксическое воздействие в клетках костного мозга отмечали в период миграции паразитов в тканях хозяина (3–14-е сутки инвазии), в семенниках – на 14 и 21-е сутки после заражения и оно возрастает в 1,6–4,6 раза при увеличении дозы заражения. В клетках костного мозга и семенников животных при миграционном аскаридозе повышается уровень апоптотических клеток, обусловленный цитотоксическим эффектом инвазии. Цитотоксическое воздействие миграции личинок аскарид наблюдали на 3, 7 и 14-е сутки инвазии в костном мозге и на 14, 21-е сутки – в семенниках хозяина и оно возрастает в 1,3–1,6 раза при увеличении дозы заражения.

Ключевые слова: *Ascaris suum*, мигрирующие личинки, паразито-хозяинные отношения, гель-электрофорез, белые мыши, генотоксичность.

Метаболиты мигрирующих личинок *Ascaris suum* обладают кластогенным воздействием на соматические клетки костного мозга белых мышей, индуцируя в нем вторичные повреждения ДНК за счет увеличения уровней микроядродержащих поли-, нормохроматофильных эрит-

роцитов и аберрантных клеток. Наибольшая выраженность цитогенетических нарушений приходится на период активной миграции личинок аскарид по кровяному руслу и эффект зависит от дозы заражения [1].

При миграционном аскаридозе в семенниках мышей повышаются

уровни микроядродержащих клеток, снижается выход сперматозоидов в придатки, что обусловлено кластогенным и цитотоксическим эффектами инвазии [2]. Наиболее выраженные цитогенетические изменения в клетках хозяина отмечают на 14–28-е сутки инвазии. Изучение изменений уровней первичных повреждений ДНК соматических и генеративных клеток хозяина, а также апоптотических клеток ранее не проводились.

Цель исследования – изучить возможные генотоксические и цитотоксические эффекты в клетках костного мозга и семенников хозяина при экспериментальном миграционном аскаридозе.

Материалы и методы

Исследования проводили на 140 мышах-самцах линии СВА массой 16–18 г, разделенных на четыре группы по 35 животных в каждой. Мышам 1-й группы (негативный контроль) вводили внутрижелудочно 0,2 мл 2%-ного крахмального геля. Животных 2-й группы заражали инвазионными яйцами *A. suum* внутрижелудочно в дозе 5, 3-й – 20 и 4-й – 40 яиц/г массы тела [3]. Убой контрольных и зараженных животных (по 5 на срок наблюдения) проводили путем декапитации на 3, 7, 14, 21, 28, 60 и 90-е сутки от начала инвазии. Клеточные суспензии костного мозга и клеток сперматогенеза получали из бедренных костей и семенников мышей [4]. Щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод ДНК-комет) проводили по методу Singh et al., модифицированному Hellman et al. и нами [4, 6, 8], при ис-

пользовании камеры с силовой установкой для электрофореза фирмы *Sigma*. Время электрофореза – 20 минут при силе тока 25 В и напряжении 300 мА. Микропрепараты окрашивали раствором этидия бромиды и анализировали на люминесцентном микроскопе Микмед-2 фирмы «ЛОМО» при увеличении 600х. Изображения «комет» получали при помощи цифровой фотокамеры Nikon Coolpix-4500. Повреждения молекулы ДНК определяли при помощи автоматической программы «CASP v.1.2.2» [7]. В микропреparate подсчитывали по 50 клеток, в каждой из которых учитывали следующие показатели генотоксичности: «длину хвоста кометы» в пикселях; процент ДНК в «хвосте кометы»; «момент хвоста» («длина хвоста», умноженная на процент ДНК в «хвосте кометы»). Для оценки цитотоксического воздействия метаболитов личинок аскарид в 100 случайно выбранных клетках определяли процент апоптотических, имеющих минимальные размеры ядра и большой «хвост кометы». Результаты обрабатывали статистически с использованием программы *Excel 2002*. Рассчитывали среднюю арифметическую и ее стандартное отклонение. Достоверность выявленных различий определяли с учетом *t*-критерия Стьюдента.

«Момент хвоста» и уровни апоптотических клеток костного мозга и семенников зараженных животных сравнивали с показателем негативного контроля, а также для установления дозозависимого эффекта генотоксического и цитотоксического воздействий метаболитов личинок

аскарид с данными животных, инвазированных в более низких дозах.

Результаты и обсуждение

Методом ДНК-комет в клетках костного мозга контрольных животных установлено, что «длина хвостов

комет» варьировала от $7,60 \pm 2,88$ до $8,98 \pm 2,01$, процент ДНК в «хвостах комет» – от $1,31 \pm 0,50$ до $3,09 \pm 1,72$, «момент хвоста» – от $0,14 \pm 0,03$ до $0,32 \pm 0,12$ (рис. 1).

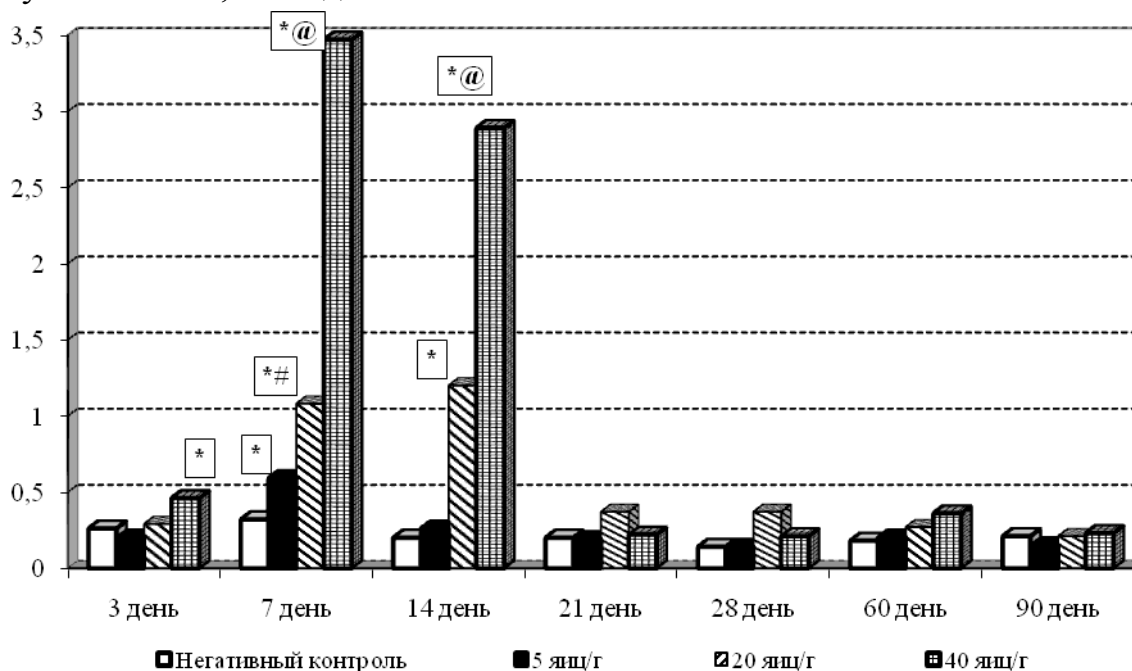


Рис. 1. «Момент хвоста» клеток костного мозга мышей-самцов при миграционном аскаридозе (* – достоверное отличие от негативного контроля, # – от данных дозы 5 яиц/г, @ – от данных дозы 20 яиц/г при $P < 0,01-0,05$)

При заражении животных в дозе 5 яиц/г массы тела в костном мозге все исследуемые показатели генотоксичности на 3-и сутки инвазии не отличались от уровня негативного контроля. На 7-е сутки опыта «длина хвостов комет» в 1,7 раза была выше контрольного уровня. Процент ДНК в «хвостах комет» у зараженных животных ($3,86 \pm 0,69$) в 1,8 раз превысил контрольный показатель. «Момент хвоста» клеток костного мозга инвазированных животных в 1,8 раз был выше контрольного уровня (рис. 1). К 14-м суткам опыта процент ДНК в «хвостах комет» ($2,33 \pm 0,36$) у зараженных животных в 1,5 раз был выше по сравнению с контрольным

уровнем, тогда как «длина хвостов комет» и «момент хвоста» не отличались от показателей контроля. На 21, 28, 60 и 90-е сутки опыта все показатели генотоксичности у инвазированных животных не отличались от контрольных.

У животных, зараженных в дозе 20 яиц/г массы тела, в костном мозге все исследуемые показатели генотоксичности на 3-и сутки инвазии не отличались от уровня негативного контроля. На 7-е сутки опыта «длина хвостов комет» клеток костного мозга составила $25,60 \pm 8,85$, что было в 2,9 и 1,6 раза выше показателей негативного контроля и дозы 5 яиц/г соответственно. Процент ДНК в «хво-

стах комет» у зараженных животных ($5,80 \pm 1,06$) в 2,6 раза превысил контрольный уровень и в 1,5 раза – от показателей при заражении в дозе 5 яиц/г. «Момент хвоста» клеток костного мозга был выше контрольного уровня в 3,4 раза и превышал в 1,8 раза дозу заражения, составляющую 5 яиц/г (рис. 1). На 14-е сутки наблюдения «длина хвостов комет» ($18,14 \pm 5,85$) была в 2 раза выше показателя контроля. Процент ДНК в «хвостах комет» составил $5,75 \pm 2,54$, т.е. в 3,7 раза превысил контрольный показатель, а также в 2,4 раза – данные показателей заражения в дозе 5 яиц/г. «Момент хвоста» клеток костного мозга превысил показатели контроля и дозы заражения 5 яиц/г в 6 и 4,6 раз соответственно. В остальные сроки наблюдений все исследуемые показатели генотоксичности не отличались от контроля.

При увеличении дозы заражения до 40 яиц/г на 3-и сутки опыта «длина хвостов комет» клеток костного мозга ($12,54 \pm 1,93$) была выше контрольного уровня в 1,4 раза. Процент ДНК в «хвостах комет» составил $3,26 \pm 0,63$ и был выше в 1,4 раза по сравнению с негативным контролем. «Момент хвоста» превысил в 1,8 раза показатель контроля (рис. 1). На 7-е сутки инвазии «длина хвостов комет» ($34,60 \pm 8,79$) в 3,9 раза была выше контрольного уровня. Процент ДНК в «хвостах комет» составил $9,81 \pm 2,82$, что было выше показателей контроля и дозы заражения 20 яиц/г в 4,4 и 1,7 раза соответственно. «Момент хвоста» был выше контроля в 10,8 раза и в 3,2 раза превысил данные дозы заражения 20 яиц/г. На 14-е

сутки наблюдения «длина хвостов комет» составила $30,00 \pm 5,39$ и была в 3,3 и 1,6 раза выше контроля и показателя дозы заражения 20 яиц/г соответственно. Процент ДНК в «хвостах комет» ($9,64 \pm 3,51$) превышал контрольный показатель в 6,1 раза. «Момент хвоста» клеток костного мозга был выше контрольного уровня и дозы заражения 20 яиц/г в 14,4 и 2,4 раза соответственно. В остальные сроки наблюдения все показатели генотоксичности у инвазированных животных не отличались от контрольных.

В клетках семенников контрольных животных во время опыта «длина хвостов комет» варьировала от $11,20 \pm 4,44$ до $20,40 \pm 8,59$, процент ДНК в «хвостах комет» был от $2,96 \pm 0,86$ до $4,93 \pm 0,68$, «момент хвоста» изменялся в пределах от $0,45 \pm 0,27$ до $0,80 \pm 0,20$ (рис. 2).

При дозе заражения 5 яиц/г массы тела в семенниках все исследуемые показатели генотоксичности на 3, 7 и 14-е сутки инвазии не отличались от данных негативного контроля. На 21-е сутки опыта процент ДНК в «хвостах комет» ($9,07 \pm 2,57$) превышал контрольный уровень в 3 раза. «Момент хвоста» был в 3 раза выше контрольного показателя (рис. 2). В последующие периоды наблюдений достоверных отличий у зараженных животных по сравнению с контрольными не наблюдали.

При дозе заражения 20 яиц/г все исследуемые показатели на 3 и 7-е сутки инвазии достоверно не отличались от данных негативного контроля. На 14-е сутки процент ДНК в «хвостах комет» ($9,84 \pm 2,56$) был вы-

ше в 2,3 раза показателя негативного контроля. «Момент хвоста» превышал контрольный показатель в 3 раза (рис. 2). На 21-е сутки наблюдения процент ДНК в «хвостах комет» в 4,6 раза, а «момент хвоста» в 5,3 раза превысили контрольные показатели. Процент ДНК в «хвостах комет» и

«момент хвоста» в 1,7 и 1,5 раза соответственно превышали показатели дозы заражения 5 яиц/г. В остальные сроки наблюдения показатели зараженных животных не отличались от таковых у негативного контроля.

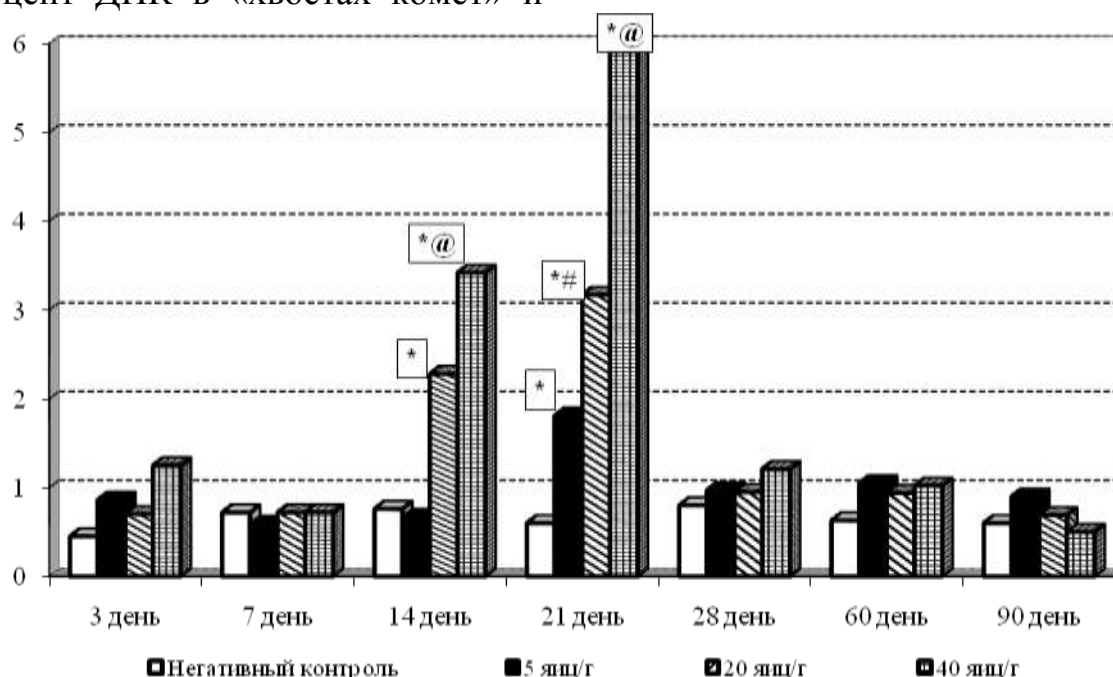


Рис. 2. «Момент хвоста» клеток семенников мышей-самцов при миграционном аскаридозе (* – достоверное отличие от негативного контроля, [@] – от данных дозы 20 яиц/г при $P < 0,01-0,05$)

При увеличении дозы заражения до 40 яиц/г у животных все исследуемые показатели на 3 и 7-е сутки наблюдения не отличались от контрольных. На 14-е сутки процент ДНК в «хвостах комет» ($11,07 \pm 1,65$) у зараженных животных в 2,5 раза был выше, чем в контроле. «Момент хвоста» был выше в 4,5 и 1,5 раза по сравнению с данными контроля и дозы заражения 20 яиц/г соответственно. На 21-е сутки «длина хвостов комет» у зараженных мышей ($31,46 \pm 8,50$) в 1,6 раза превышала контрольный уровень. Процент ДНК в «хвостах комет» составил

$17,88 \pm 2,61$, что в 6 раз было больше по сравнению с данными контроля и в 1,3 раза – дозы в 20 яиц/г. «Момент хвоста» превышал в 9,8 и 1,8 раза показатели контроля и дозы заражения 20 яиц/г соответственно. В остальные сроки наблюдения данные зараженных животных не отличались от показателей негативного контроля.

При постановке метода ДНК-комет в клетках костного мозга контрольных животных процент апоптотических клеток варьировал от $0,60 \pm 0,55$ до $1,60 \pm 0,89$ (рис. 3).

У зараженных в дозе 5 яиц/г массы тела животных процент апоп-

тотических клеток лишь на 7-е сутки был в 2,3 раза выше контрольного значения.

При увеличении дозы заражения до 20 яиц/г у животных на 7-е сутки наблюдения показатель цитотоксичности в 3,6 раза был выше уровня негативного контроля и в 1,6 раза пре-

вышал данные дозы заражения 5 яиц/г. На 14-е сутки опыта процент апоптотических клеток был в 2,6 раза выше уровня негативного контроля. В остальные сроки наблюдения достоверных отличий у зараженных животных по сравнению с контрольными не наблюдали.

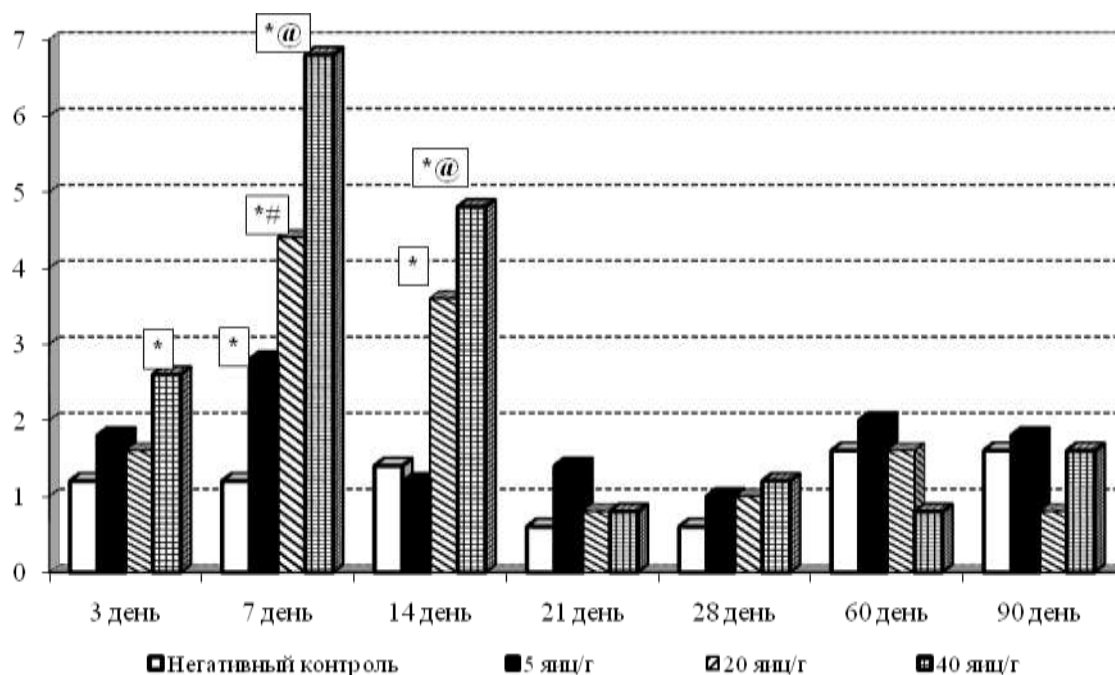


Рис. 3. Проценты апоптотических клеток костного мозга мышей-самцов при миграционном аскаридозе (* – достоверное отличие от негативного контроля, # – от данных дозы заражения 5 яиц/г, @ – от данных дозы заражения 20 яиц/г при $P < 0,01-0,05$)

При увеличении дозы заражения до 40 яиц/г на 3-и сутки наблюдения процент апоптотических клеток был выше данных негативного контроля в 2,2 раза. На 7-е сутки опыта показатель цитотоксичности у зараженных животных превышал в 5,6 и 1,5 раза данные негативного контроля и дозы заражения 20 яиц/г соответственно. На 14-е сутки наблюдения у зараженных животных апоптотических клеток в 3,4 раза было больше по сравнению с контрольным показателем и в 1,3 раза – с данными дозы заражения 20 яиц/г. В остальные сроки

наблюдения достоверных отличий у зараженных животных по сравнению с контрольными не наблюдали.

При постановке метода ДНК-комет в клетках семенников контрольных животных процент апоптотических клеток варьировал от $3,00 \pm 1,22$ до $11,00 \pm 2,24$ (рис. 4).

У зараженных в дозе 5 яиц/г массы тела животных только на 21-е сутки наблюдения процент апоптотических клеток семенников был выше в 1,7 раза по сравнению с негативным контролем.

При увеличении дозы заражения до 20 яиц/г на 14-е сутки уровень апоптотических клеток в 1,4 раза и на 21-е сутки – в 1,7 раза были выше

контрольного показателя. В остальные сроки наблюдения достоверных изменений не отмечали.

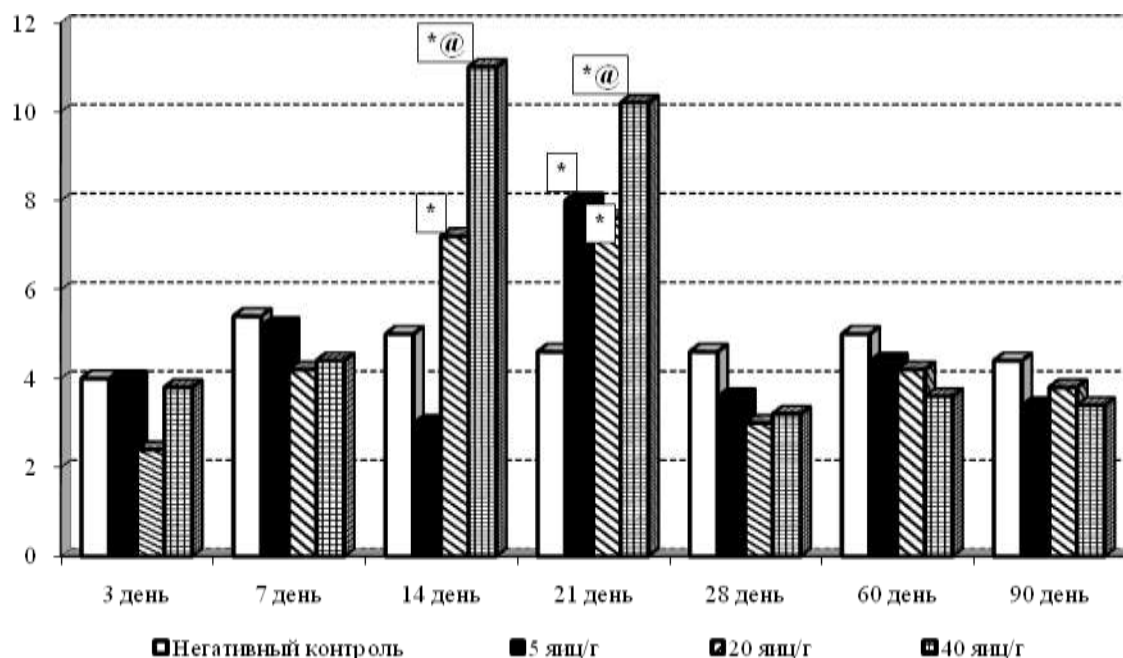


Рис. 4. Процент апоптотических клеток семенников мышей-самцов при миграционном аскаридозе (* – достоверное отличие от негативного контроля, @ – от данных дозы заражения 20 яиц/г при $P < 0,01-0,05$)

При дозе заражения 40 яиц/г на 14-е сутки наблюдения показатель цитотоксичности был в 2,2 и 1,5 раза выше по сравнению с уровнями негативного контроля и дозы заражения 20 яиц/г соответственно. На 21-е сутки процент апоптотических клеток был выше негативного контроля и дозы заражения 20 яиц/г в 2,2 и 1,3 раза соответственно. На 3, 7, 28, 60 и 90-е сутки опыта показатели цитотоксичности у зараженных животных не отличались от данных контроля.

Установлено, что миграция личинок аскарид сопровождается генотоксическим эффектом как в соматических, так и в половых клетках инвазированного хозяина, который характеризуется увеличением количества одноцепочечных разрывов и

щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК в клетках костного мозга и семенников *in vivo*. Увеличение уровня первичных повреждений ДНК в клетках хозяина обусловлено повышением числа мелких разрывов ДНК (рост «длины хвостов комет»), процента поврежденной ДНК и основного показателя генотоксичности – «момента хвоста». «Длина хвостов комет» при инвазии повышалась в среднем в 1,4–3,3 раза в костном мозге и 1,6 раза в семенниках только на 21-е сутки наблюдения при дозе заражения 40 яиц/г по сравнению с контролем. Уровень поврежденной ДНК у инвазированных животных в среднем увеличивался на 0,98–8,08 % в костном мозге и на 5,51–14,92 % в семенниках по сравнению с интакт-

ными животными. В костном мозге инвазированных животных «момент хвоста» повышался в 1,8–14,4 раза и в семенниках в 3–9,8 раза по отношению к данным негативного контроля. Наиболее выраженные генотоксические эффекты в клетках костного мозга наблюдали в период активной миграции личинок аскарид в тканях хозяина (3–14-е сутки инвазии). В семенниках животных при инвазии рост генотоксических повреждений наблюдали с 14 по 21-е сутки опыта. Это можно связать с тем, что жизненный цикл клеток при сперматогенезе длительный и время развития от стволовых сперматогоний до сперматозоидов составляет более 42-х суток [7]. Поэтому рост повреждений ДНК клеток семенников наблюдают с некоторым опозданием по отношению к изменениям в костном мозге.

Генотоксическое влияние аскаридозной инвазии на клетки хозяина зависит от дозы введенного инвазионного материала при заражении и кратно достоверно возрастает при ее увеличении. Дозозависимое воздействие четко прослеживалось на росте «момента хвоста» клеток костного мозга в 1,8–4,6 раза при увеличении дозы заражения с 5 до 20 и до 40 яиц/г на 7 и 14-е сутки наблюдения. Повышение в 1,6–1,8 раза «момента хвоста» отмечали также в семенниках инвазированных мышей при увеличении дозы заражения на 14 и 21-й дни опыта.

Личинки аскарид во время миграции обладают цитотоксическим воздействием, которое характеризуется ростом процента апоптотиче-

ских соматических и генеративных клеток инвазированных животных. Цитотоксический эффект в костном мозге инвазированных животных наблюдали с 3 по 14, в семенниках – с 14 по 21-е сутки инвазии.

Цитотоксическое воздействие метаболитов личинок аскарид во время инвазии зависело от дозы заражения. При увеличении дозы заражения с 5 до 20 яиц аскарид на 1 г массы тела животного на 7-е сутки в костном мозге отмечали рост апоптоза в 1,6 раза. Дозозависимый цитотоксический эффект метаболитов личинок аскарид (рост процента апоптотических клеток в 1,3–1,5 раза) был установлен также при увеличении дозы заражения с 20 до 40 яиц/г в костном мозге на 7 и 14 и в семенниках – на 14 и 21-е сутки инвазии.

Таким образом, метаболиты мигрирующих личинок аскарид обладают генотоксическим воздействием на соматические и половые клетки хозяина, вызывая увеличение одноцепочечных разрывов, щелочнолабильных сайтов ядерной молекулы ДНК на 0,98–8,08 % в костном мозге и на 5,51–14,92 % в семенниках инвазированных животных. Генотоксическое действие в клетках костного мозга наблюдается в период миграции паразитов в тканях хозяина (3–14-е сутки инвазии), в семенниках – на 14 и 21-е сутки после заражения и возрастает в 1,6–4,6 раза с увеличением дозы введенного инвазионного материала.

В клетках костного мозга и семенников животных при миграционном аскаридозе повышается уровень апоптотических клеток, обусловлен-

ный цитотоксическим эффектом инвазии. Цитотоксическое воздействие миграции личинок аскарид отмечают на 3, 7 и 14-е сутки инвазии в кост-

ном мозге и на 14 и 21-е сутки – в семенниках хозяина и возрастает в 1,3–1,6 раза с увеличением дозы заражения.

Литература

1. Бекиш О.-Я.Л., Бекиш В.Я. // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі (Серыя біялагічных навук). – 2000. – № 2. – С. 109–113.
2. Бекиш В.Я., Колмогоров В.И., Побяржин В.В. // Вестник ВГМУ. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 67–72.
3. Бекиш В.Я. // Матер. 5-го Республ. съезд специалистов клин. лаб. диагностики Беларуси. – 1997. – С. 140–141.
4. Дурнев А.Д., Бекиш В.Я. и др. Методические рекомендации. – М., 2006. – 27 с.
5. Adler I.-D. // Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen. – 1996. – V. 352. – P. 169–172.
6. Hellman B. et al. // Int. Arch. Occup. Environ. Health. – 1997. – V. 69. – P.185–192.
7. Końca K. et al. // Mutat. Res. (Gen. Toxicol. and Environ. Mutagenesis). – 2003. – V. 534. – P. 15–20.
8. Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. // Exp. Cell Res. – 1988. – V. 175. – P.184–191.

The genotoxic and cytotoxic influence of migration of *Ascaris suum* larva on host cells

V.J. Bekish, V.V. Zorina, O.-J.L. Bekish

Metabolites of migrative *Ascaris suum* larvae have a genotoxic effect on somatic and germ cells of the host which has been established using alkaline single cells gel-electrophoresis. One note the growth of single-strand breaks, alkali-labile sites nucleus molecule DNA by 0,98–8,08 % in bone marrow and by 5,51–14,92 % in testicals of infected animals. The genotoxic effect is observed in bone marrow cells during migration of the parasite larvae in tissues of the host (3–14 days of infection), in testicals on days 14 and 21 post infection and grow by 1,6–4,6 times with increasing of infective material doze. In bone marrow and testicals cells at migrative ascariasis the level of apoptotic cells increase is due to cytotoxic effects of infection. The cytotoxic effects of migration of *A. suum* larva is observed on days 3, 7, 14 post infection in bone marrow cells as while on days 14, 21 in testicals of the host and grow by 1,3–1,6 times with increase of infective material doze.