

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ КРИСТАЛЛОГЕННОЙ
АКТИВНОСТИ БИОСРЕДЫ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНВАЗИИ *Trichinella spiralis***

А.К. МАРТУСЕВИЧ

кандидат медицинских наук

Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и
ортопедии, e-mail: *cryst-mart@yandex.ru*

О.Б. ЖДАНОВА

доктор биологических наук

Кировская государственная медицинская академия

Изучена дегидратационная структуризация мочи крыс при экспериментальном заражении их *Trichinella spiralis*. Кристаллогенную и иницирующую активность мочи животных исследовали методом тизиокристаллоскопии через 4 недели после заражения. Исследование кристаллогенных свойств и инициаторного потенциала биологических жидкостей организма может стать индикатором наличия и глубины метаболических сдвигов, вызванных гельминтами.

Ключевые слова: биокристалломика, трихинеллез, кристаллогенные свойства, моча.

Трихинеллез – системный тканевой гельминтоз с преимущественным поражением мышечной ткани, вызываемый *Trichinella spiralis* [3, 8, 9, 14, 18]. В настоящее время достаточно подробно описаны жизненный цикл, вопросы эпидемиологии и профилактики данной болезни [3, 7, 10, 11, 16, 17, 21]. Разработаны и внедрены технологии иммунодиагностики изучаемого паразитоза [9, 12, 13, 15]. С другой стороны, некоторые метаболические аспекты патогенеза и особенности ответной биохимической реакции макроорганизма-хозяина изучены недостаточно [18, 19].

Ранее установленный факт трансформации кристаллогенных свойств биологических субстратов животных при тканевых гельминтозах значим для более полного раскрытия их патогенеза [2, 5, 6]. Однако, с наших позиций, принципиальным с патофизиологических позиций является вопрос наличия связи между интенсивностью инвазии и выраженностью сдвигов собственно и иницированного кристаллогенеза биосреды.

С этой целью была проведена серия экспериментов, целью которых служило изучение результата дегидратационной структуризации мочи крыс при экспериментальном заражении их различным количеством личинок *T. spiralis*.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 30 крысах, из которых были сформированы 6 групп по 5 животных в каждой: контрольная (интактная) и 5 опытных, крыс в которых экспериментально инвазировали трихинеллами в дозе 100, 200, 500, 1000 и 2000 личинок соответственно [1, 8]. Через 4 недели безаппаратным методом получали мочу животных и исследовали ее кристаллогенную и иницирующую активность методом тизиокристаллоскопии [6]. В качестве

базисного вещества использовали 0,9%-ный раствор хлорида натрия. Результат дегидратации фиксировали на цифровую фотокамеру, затем оценивали с качественных (характеризовали особенности выявляемых морфотипов кристаллических и аморфных структур) и количественных позиций (с использованием стандартного алгоритма, включающего балльные критерии) [5, 6].

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Установлено, что кристаллогенные свойства мочи крыс существенно зависят от дозы заражения, однако данная зависимость нелинейна. Так, введение животным минимальных количеств патогенного агента приводит к умеренной активации кристаллогенеза мочи, причем картина собственной кристаллизации биологической жидкости преимущественно была сформирована одиночно-кристаллическими элементами с включением незначительного количества мелких дендритов и малых аморфных тел (рис. 1).

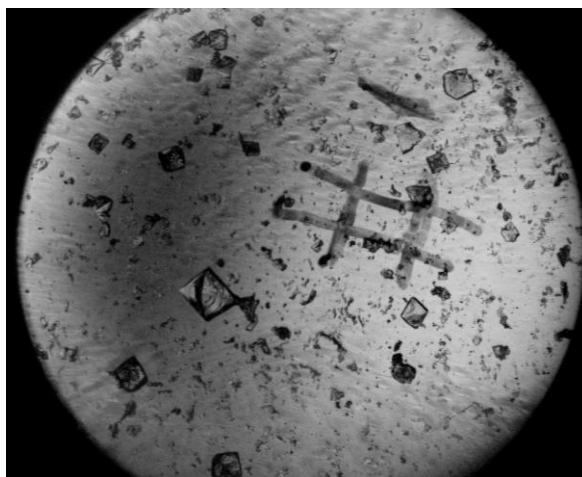


Рис. 1. Картина кристаллизации мочи крыс при заражении *T. spiralis* в дозе 100 личинок ($\times 60$)

Это может указывать на проявления ферментативно-токсической фазы развития заболевания в условиях смоделированного трихинеллеза [3]. Кроме того, в образцах мочи животных этой группы выявлено минимальное расширение краевой зоны, что косвенно свидетельствует об увеличении диапазона молекулярных масс протеинового компонента изучаемой биологической жидкости, что также служит признаком формирующейся интоксикации. На патологический характер преобразований фации биосреды при заражении животного 100 личинками трихинелл дополнительно указывает тот факт, что в микропрепаратах этих крыс существенно возрастает степень деструкции структурных элементов фации.

Принципиально иной характер реализации кристаллогенных свойств мочи выявлен при увеличении дозы заражения до 200 личинок/животное (рис. 2). В этом случае обнаружены признаки выраженного ингибирования собственной кристаллизации мочи, что проявилось в резком уменьшении количества и плотности кристаллических и аморфных элементов, а также практически полном исчезновении поликристаллических (дендритных) структур. По нашему мнению, данный факт может быть обусловлен превалированием интоксикационного синдрома в патогенезе экспериментально созданного указанной дозой личинок трихинелл паразитоза над специфическими кристалло-

скопическими проявлениями воспалительного процесса. Следовательно, увеличение дозы заражения способствует ускорению темпов развития гельминтоза.



Рис. 2. Картина кристаллизации мочи крыс при заражении *T. spiralis* в дозе 200 личинок ($\times 60$)

С другой стороны, признаки патологической трансформации кристаллоскопической картины сохраняются и при минимизации структурных элементов. Так, увеличивается степень деструкции присутствующих одиночных кристаллов, а также продолжается расширение краевой зоны микропрепарата, что свидетельствует о влиянии метаболитов гельминта на кристаллостаз рассматриваемого биологического субстрата [5].

При заражении крыс 500 личинками трихинелл кристаллостаз мочи снова смещается в сторону нарастания кристаллогенной активности биосреды, причем стимуляция структуризации мочи животных данной группы более выражена, чем в случае минимальной дозы инвазии (рис. 3). На это указывает комплекс морфологических изменений кристаллоскопической картины биожидкости: укрупнение и фрагментация одиночно-кристаллических элементов, их высокая плотность в образце и дополнение многочисленными более мелкими монокристаллами и аморфными телами. Выявленная тенденция свидетельствует о превалировании воспалительного компонента патологического процесса над интоксикационным, для которого более характерно ингибирование кристаллогенеза [5]. Кроме того, нарастающая выраженность сдвигов кристаллостаза подтверждает утяжеление метаболических нарушений в организме животного, ассоциированных с инвазией трихинелл.

Эти изменения собственного кристаллогенеза мочи крыс дополняются нарастанием степени деструкции структурных элементов, а также продолжением увеличения доли краевой зоны в радиусе фации, что подчеркивает выраженность дизметаболического состояния при использовании средней дозы патологического агента – 500 личинок.

Дальнейшее увеличение количества вводимых личинок (до 1000 ед./животное) вызывает качественно иные преобразования кристаллогенных свойств мочи (рис. 4). Так, в результате проведенных исследований установлено, что такая доза заражения способствует формированию в кристаллограммах биосреды преимущественно дендритных элементов в сочетании с многочисленными одиночно-кристаллическими структурами и аморфными телами, практически составляющими микропрепараты мочи при экспериментальной инвазии меньшим количеством личинок.

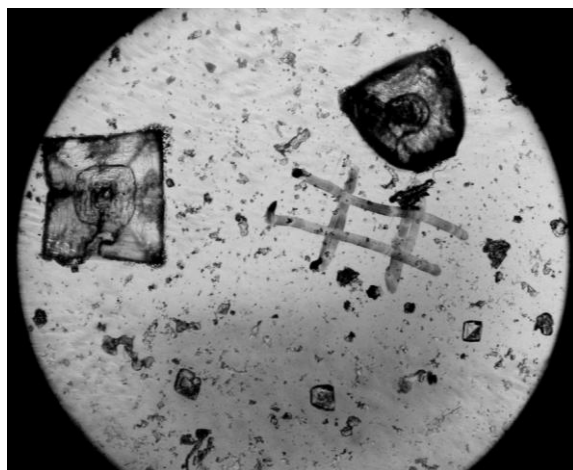


Рис. 3. Картина кристаллизации мочи крыс при заражении *T. spiralis* в дозе 500 личинок ($\times 60$)



Рис. 4. Картина кристаллизации мочи крыс при заражении *T. spiralis* в дозе 1000 личинок ($\times 60$)

Это может свидетельствовать о развитии у животных этой группы второй (аллергической) стадией трихинеллеза, характеризующейся активацией иммунного ответа и, следовательно, повышением уровня в крови и моче антител – белковых макромолекул [11, 12, 18], принципиально меняющих микроокружение кристаллизующихся минеральных компонентов биологической жидкости. Можно предположить, что указанные макромолекулы конкурируют за создание собственной гидратной оболочки с формирующимися кристаллогидраты солями, визуализируемыми на микроуровне в виде поликристаллических (дендритных) элементов [5]. Побочным признаком существенного расширения белкового пула мочи служит выраженное расширение краевой зоны. Также в кристаллоскопических фациях биосреды крыс этой группы выявляется высокая степень деструкции элементов, которая может косвенно указывать на сохранение относительного преобладания минеральных кристаллообразующих элементов над протеиновыми.

Применение максимальной дозы заражения (2000 личинок/животное) вызывало аналогичные по направленности, но более выраженные метаболические трансформации по сравнению с крысами предшествующей группы (рис. 5). Фация мочи в этом случае практически полностью состояла из денд-

ритных элементов (преимущественно, модификаций фигуры «крест»), тогда как одиночные кристаллы служили лишь минорной фракцией с минимальным представительством. С учетом принятой патогенетической модели, подобная динамика кристаллогенных свойств биосреды свидетельствует об утяжелении течения заболевания у данных крыс за счет значительно более активной иммунной реакции, что приводит к нарастанию концентрации иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов в крови и, следовательно, в моче [12, 18]. В свою очередь, это обуславливает резкое увеличение доли свободной воды, расходуемой в процессе дегидратации биосреды на формирование гидратной оболочки макромолекул с параллельным снижением ее утилизации на синтез кристаллогидратов, составляющих дендритные элементы. Подобные физико-химические процессы детерминируют появление в кристаллоскопической картине мочи крыс данной группы многочисленных поликристаллических структур с более низкой степенью деструкции, чем в микропрепаратах биосубстрата животных предшествующей группы. Увеличение доли протеинового компонента в биосреде, реализуемое преимущественно за счет глобулиновых белков, дополнительно подтверждается сохранением тенденции к расширению краевой зоны фаций по сравнению с кристаллограммами крыс, которым вводили по 1000 личинок *T. spiralis*.

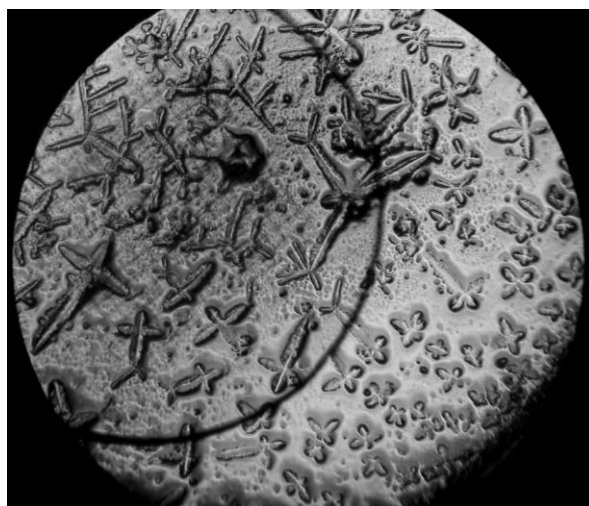


Рис. 5. Картина кристаллизации мочи крыс при заражении *T. spiralis* в дозе 2000 личинок ($\times 60$)

Рассмотренные тенденции качественного преобразования кристаллоскопической картины мочи крыс в зависимости от дозы заражения полностью подтверждаются результатами морфометрического анализа данных фаций (рис. 6). В частности, динамика индекса структурности и кристаллизуемости образцов мочи, являющихся количественной мерой активности собственного кристаллообразования биосреды и характеризующих сложность структуропостроения и плотность кристаллических элементов в микропрепарате соответственно, указывает на умеренное увеличение кристаллогенного потенциала биосубстрата при введении минимальных количеств патогенного агента (100 личинок/животное) с дальнейшим выраженным ингибированием структуризации при дозе заражения 200 личинок и последующим прогрессивным нарастанием кристаллизуемости и индекса структурности практически до максимальных значений (при инвазионной дозе 2000 личинок).

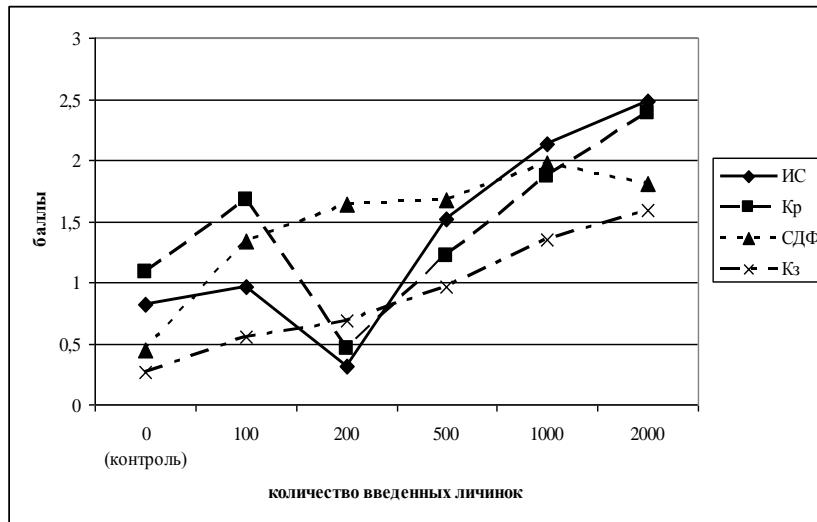


Рис. 6. Динамика морфометрических показателей фаций мочи крыс в зависимости от интенсивности инвазии

Это подчеркивает нелинейность связи между дозой трихинелл и характером вызываемых ею метаболических сдвигов (и, следовательно, изменений собственного кристаллогенеза), которая является непосредственным патогенетическим следствием фазности течения трихинеллеза и ускорением его развития под влиянием увеличения интенсивности инвазии.

Аналогичные, но меньшие по выраженности сдвигов тенденции были зарегистрированы при морфометрическом анализе тезиграмм мочи крыс сформированных групп (рис. 7). Тезиграфический индекс и кристалличность (сходные по функциональному значению с кристаллизуемостью и индексом структурности кристаллограмм соответственно) демонстрируют изменения, сочетаемые с динамикой указанных параметров кристаллоскопии ($r = 0,76$ и $0,68$; $P < 0,01$ соответственно). Сдвиги степени деструкции тезиграмм и выраженности краевой зоны фаций также аналогичны обнаруженным в кристаллограммах мочи животных.

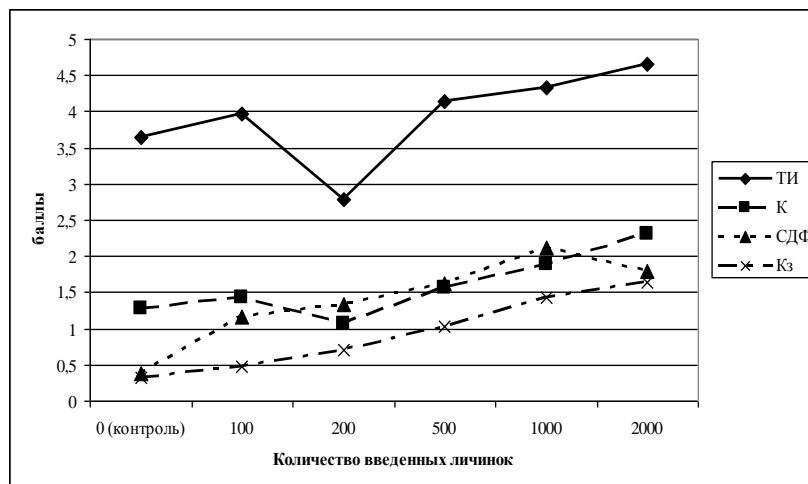


Рис. 7. Результаты морфометрического анализа тезиграмм мочи крыс при экспериментальном трихинеллезе

На основании полученных данных можно заключить, что исследование кристаллогенных свойств и инициаторного потенциала биологических жидкостей организма можно использовать в качестве индикатора наличия и глубины метаболических сдвигов, связанных с наличием паразитоза.

Литература

1. Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедева М.Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине / Под ред. И.В. Тарасевича. – М.: Наука, 1989. – 278 с.
2. Ашихмин С.П., Жданова О.Б., Масленникова О.В. и др. Перспективы применения кристаллографических методов диагностики альвеококкоза в Кировской области // Рос. паразитол. журнал. – 2011. – № 1. – С. 94–99.
3. Константинова Т.Н., Беляев А.Е. Трихинеллез. – М.: РМАПО, 1999. – 28 с.
4. Мартусевич А.К. и др. Физиология и патология кристаллостаза: общая парадигма и перспективы изучения // Вестн. Нижегород. ун-та. – 2010. – №1. – С. 135–139.
5. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Особенности свободного кристаллогенеза мочи здоровых и зараженных гельминтами грызунов // Тр. Всерос. ин-та гельминтол. – 2007. – Т. 45. – С. 153–163.
6. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Информативность исследования кристаллообразования при зоонозах на модели животных // Изв. высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2006. – № 1. – С. 30–38.
7. Михайлицин Ф.С., Лебедева М.Н., Веретенникова Н.Л. и др. Активность отечественного антигельминтика трихлофена на моделях гельминтов человека // Мед. паразитол. и паразит. бол. – 2004. – № 1. – С. 44–48.
8. Репина Е.А., Коваленко Ф.П., Кухалева И.В. Метод прижизненной диагностики экспериментального трихинеллеза // Мед. паразитол. и паразит. бол. – 2009. – № 1. – С. 45–48.
9. Трухачев В.И., Толоконников В.П., Лысенко И.О. Научные основы экологической паразитологии. – Ставрополь: АГРУС, 2005. – 300 с.
10. Толстой В.А. Действие вермокса на процессы перекисного окисления липидов у крыс при экспериментальном трихинеллезе // Тр. VII Междунар. науч.-практ. конф. «Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики протозоозов, гельминтозов и арахноэнтомозов человека, животных и растений. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 145–148.
11. Appleton J.A., Romaris F. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host // Vet. Parasitol. – 2001. – V. 101, № 3–4. – P. 249–260.
12. Bruschi F., Chiumiento L. Immunomodulation in trichinellosis: does *Trichinella* really escape the host immune system? // Endocr. Metab. Immune Disord. Drug. Targets. – 2012. – V. 12, № 1. – P. 4–15.
13. Nava-Castro K., Hernández-Bello R., Muñoz-Hernández S. et al. New method to disaggregate and analyze single isolated helminthes cells using flow cytometry: proof of concept // J. Biomed. Biotechnol. – 2011. – V. 2011. – ID257060.
14. Neghina R., Moldovan R., Marincu I. et al. The roots of evil: the amazing history of trichinellosis and *Trichinella* parasites // Parasitol. Res. – 2012. – V. 110, № 2. – P. 503–508.
15. Pastusiak K. Methods and tools for parasite differentiation within the genus *Trichinella* // Wiad Parazytol. – 2006. – V. 52, № 3. – P. 165–173.
16. Ren H.J., Cui J., Wang Z.Q., Liu R.D. Normal mouse intestinal epithelial cells as a model for the in vitro invasion of *Trichinella spiralis* infective larvae // PLoS One. – 2011. – V. 6, № 10. – e27010.
17. Romaris F., Appleton J.A. Invasion of epithelial cells by *Trichinella spiralis*: in vitro observations // Parasite. – 2001. – V. 8, 2 Suppl. – S. 48–50.

18. Wakelin D., Farias S.E., Bradley J.E. Variation and immunity to intestinal worms // *Parasitology*. – 2002. – V. 125. – S. 39–50.

19. Wang Z.Q., Li L.Z., Jiang P. et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trichinella* isolates from different provinces in mainland China // *Parasitol. Res.* – 2012. – V. 110, № 2. – P. 753–757.

20. Wang Z.Q., Wang L., Cui J. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* proteins in intestinal epithelial cells after culture with their larvae by shotgun LC-MS/MS approach // *J. Proteomics*. – 2012. – V. 75, № 8. – P. 2375–2383.

21. Yang C.Q., Wei Y.Y., Leng Y.X. et al. Vesicular glutamate transporter-3 contributes to visceral hyperalgesia induced by *Trichinella spiralis* infection in rats // *Dig. Dis. Sci.* – 2012. – V. 57, № 4. – P. 865–872.

Investigation of interaction between biological fluid crystallogenic activity and intensity of experimental infection by *Trichinella spiralis*

A.K. Martusevich, O.B. Zhdanova

Urine dehydration structurization at experimental trichinellosis of rats is studied. In 4 weeks after exposure rats urine was analyzed with biocrystallogenic methods. It was stated, that urine crystallogenic properties changes according to intensity of infection.

Keywords: biocrystallogenic, trichinellosis, crystallogenic, urine.