

© ПОБЯРЖИН В.В., БЕКИШ Вл.Я., 2003

НАРУШЕНИЯ В ГЕНОМЕ ХОЗЯИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИМЕНОЛЕПИДОЗЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗЫ ВВЕДЕННОГО ИНВАЗИОННОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ

ПОБЯРЖИН В.В., БЕКИШ Вл.Я.

*Витебский государственный медицинский университет,
кафедра медицинской биологии и общей генетики*

Резюме. Изучены цитогенетические повреждения в наследственном аппарате соматических и генеративных клеток хозяина при экспериментальном гименолепидозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала при заражении. Для анализа состояния генома хозяина при гименолепидозе проводили микроядерные тесты в костном мозге и семенниках, а также хроматингетерогенный тест в семенниках. Установлено, что гименолепидозная инвазия сопровождается синхронным повреждением наследственного аппарата соматических и генеративных клеток сперматогенеза хозяина. Уровень нарушений в геноме хозяина при экспериментальном гименолепидозе зависит от стадий развития паразита и максимально выражен на 3 и 14 дни инвазии. Тяжесть цитогенетических повреждений в наследственном аппарате клеток хозяина связана с дозой введенного инвазионного материала при заражении и кратно достоверно возрастает при ее увеличении в линейной зависимости.

Ключевые слова: карликовый цепень, микроядерный тест, костный мозг, семенники, мутагенез.

Abstract. The cytogenetic damages in the hereditary apparatus of somatic and generative cells of the host depending upon the dose of invasion material on infection were investigated in experimental hymenolepiasis. The micronucleus tests in bone marrow and testicles as well as the chromatingeterogenic test in testicles were used to analyze the host genome state in hymenolepiasis. It was established that hymenolepiasis invasion caused synchronous damages in the hereditary apparatus of somatic and generative cells of the host spermatogenesis. The range of these host genome damages depends upon the stages of parasite development and is maximally marked on the 3rd and the 14th days of invasion. The severity of cytogenetic damages in the hereditary apparatus of the host cells is associated with the dose of invasion material on infection and an authentic divisible increase is observed at its augmentation in linear dependence.

Метаболиты власоглавов, трихинелл и мигрирующих личинок аскарид вызывают нарушения в наследственном аппарате соматических клеток экспериментальных животных, которые зависят от дозы введенного инвазионного материала, становятся более значимыми при ее увеличении и характеризуются повышением уровня микроядродержащих клеток эритроцитарного ряда, аберрантных и анеуплоидных клеток костного мозга [8, 4, 2].

Нами было установлено, что у мышей, зараженных в дозе 20 инвазионных яиц *Hymenolepis nana* var. *muris* на 1 г массы тела, отмечается повышение уровней поли- и нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами, числа гипоплоидных, гиперплоидных и аберрантных клеток костного мозга, а также микроядродержащих сперматогониев, сперматозоидов и сперматид в семенниках. Эти изменения зависели от стадий развития паразитов и были наиболее выражены в период их высокой биологической активности [3, 5]. Однако взаимосвязь между дозой заражения и тяжестью цитогенетических изменений в соматических и генеративных клетках при гименолепидозе не изучена.

Цель работы – изучить цитогенетические повреждения в наследственном аппарате соматических и генеративных клеток хозяина при экспериментальном гименолепидозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала при заражении.

Методы

Исследование проведено на 400 мышам-самцах линии СВА массой 16-18 г, которые были разделены на две группы (I и II) по 200 животных в каждой. Группы делилась на четыре подгруппы по 50 мышей. Животным первых подгрупп I-ой и II-ой групп (интактные контроли) вводили 0,2 мл 2% крахмального геля, остальных заражали внутрижелудочно в дозах 5, 20 или 40 инвазионных яиц *H. nana* var. *muris* на 1 г массы тела соответственно [6]. Забой контрольных и зараженных животных про-

водили на 3, 7, 14, 21 и 28-й дни от начала инвазии. На каждый срок наблюдения во всех подгруппах брали по 10 животных.

В группе I проводили микроядерные тесты в костном мозге [9] и семенниках [1]. У каждого животного исследовалось по 1000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), 1000 нормохроматофильных эритроцитов (НХЭ), а также по 200 сперматогониев (СГ), 200 сперматозоидов (СЦ), 200 сперматид (СТ) и определялось количество этих клеток с микроядрами (МЯ). Микроскопические исследования выполнены на микроскопе DMRB фирмы Leica при увеличении 1200х.

В группе II изучали повреждения молекулы ДНК в сперматозоидах мышей с применением хроматингетерогенного теста [7], модифицированного нами для животных. Для этого выделяли канальцы из семенников мышей, промывали их в фарфоровой ступке с 5 мл 2,2 % раствора трехзамещенного цитрата натрия, затем измельчали изогнутой препаровальной иглой в 3 мл раствора Тироде. Суспензию выдерживали 5 мин при комнатной температуре в центрифужной пробирке для осаждения крупных фрагментов семенных канальцев. Верхний слой суспензии переносили во вторую пробирку и центрифугировали 5 минут при 1300 об/мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспензировали в 3 мл раствора Тироде и повторяли центрифугирование при тех же параметрах. После удаления супернатанта взвесь клеток ресуспензировали в 0,3 мл надосадочной жидкости. Мазок готовили с помощью предметного стекла со сточенным под углом краем. Микропрепараты высушивали, фиксировали 2 часа в жидкости Карнуа и окрашивали флюорохром акридиновым-оранжевым (2 мг красителя на 190 мл буфера: 100 мл 1н C_2H_3COONa , 90 мл 1н HCl) разведенным 1 к 10 дистиллированной водой в течение 7 минут, после чего промывали в дистиллированной воде и высушивали без доступа света в течение 24 часов при комнатной температуре. Анализ микропрепаратов проводили на люминисцентном микроскопе Микмед-2 фирмы Ломо при увеличении 600х. У каждого животного исследовалось 1000 сперматозоидов и определялись проценты с двуцепочечной нормальной (зеленое свечение) и одноцепочечной денатурированной (желтое,

оранжевое или красное свечение) молекулами ДНК.

Полученные результаты обрабатывались статистически на ПЭВМ с использованием программ Statgraphics 2.1 и Excel 2000, просчитывалась средняя арифметическая и ошибка средней арифметической ($M+m$). Достоверность выявляемых различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты

При проведении микроядерного теста в костном мозге у контрольных животных I группы МЯ в НХЭ не было отмечено, а количество микроядеросодержащих ПХЭ в течение опыта варьировало от $0,5+0,15$ до $1,1+0,17$ (рис. 1).

1,6 раза, чем у животных, зараженных в дозе 5 яиц/г (рис. 1). Количество микроядеросодержащих НХЭ достоверно в 5 раз превышало аналогичный показатель контрольной группы. На 7 день наблюдения число ПХЭ с МЯ в 4 раза было выше, чем у незараженных животных ($P<0,01$). К 14 дню отмечалось достоверное увеличение микроядеросодержащих ПХЭ более чем в 2,5 раза по сравнению с данными интактного контроля.

У мышей, зараженных в дозе 40 яиц/г массы тела, к 3 дню наблюдения количество ПХЭ в 4,9 раза и НХЭ в 13 раз достоверно превышало контрольные показатели (рис. 1). При проведении анализа данных животных, зараженных в дозах 40 и 20 яиц/г, у первых было ПХЭ и НХЭ с МЯ в 1,5 и 2,6 раза больше соответственно

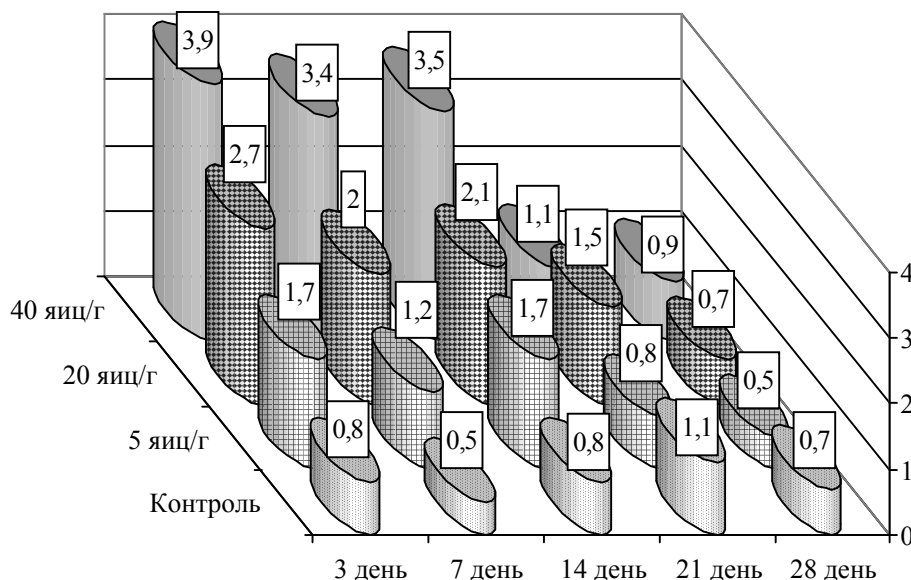


Рис. 1. Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей при экспериментальном гименолепидозе в зависимости от дозы введенного инвазивного материала и сроков наблюдения.

У зараженных в дозе 5 яиц/г массы тела мышей на 3 день наблюдения количество микроядеросодержащих ПХЭ в костном мозге было достоверно выше в 2,1 раза, чем в контрольной группе (рис. 1). К 14 дню количество ПХЭ с МЯ в 2,1 раза превышало показатели интактного контроля ($P<0,01$). Число НХЭ с МЯ во все сроки наблюдения не отличалось от контрольных уровней ($P>0,05$).

При увеличении дозы заражения до 20 яиц/г массы тела на 3 день число ПХЭ с МЯ достоверно превышало данные интактного контроля более чем в 3 раза, а также было выше в

($P<0,01$). К 7 дню эксперимента уровни микроядеросодержащих ПХЭ в 6,8 раза и НХЭ с МЯ в 7 раз достоверно были выше, чем у незараженных мышей. У инвазированных в дозе 40 яиц/г животных отмечалось увеличение числа ПХЭ с МЯ в 1,7 раза при сравнении с данными мышей, зараженных в дозе 20 яиц/г ($P<0,01$). На 14 день наблюдения количество ПХЭ с МЯ в 4,4 раза и НХЭ с МЯ в 9 раз превышало показатели интактного контроля ($P<0,01$). При сравнении данных животных, зараженных в дозах 40 и 20 яиц/г, у первых было отмечено достоверное увеличение числа микроядеросодержащих ПХЭ в 1,8 раза.

При проведении микроядерного теста в семенниках у контрольных животных I группы количество микроядеросодержащих СГ, СЦ и СТ в течение опыта находилось в пределах от 0,2+0,13 до 0,6+0,16 (рис. 2).

зателей животных, зараженных в дозе 40 и 20 яиц/г, отмечено достоверное увеличение СГ и СЦ в 1,8 раза в каждом виде клеток. К 14 дню наблюдения количество микроядеросодержащих СГ в 5,3 и 2 раза соответственно превышало

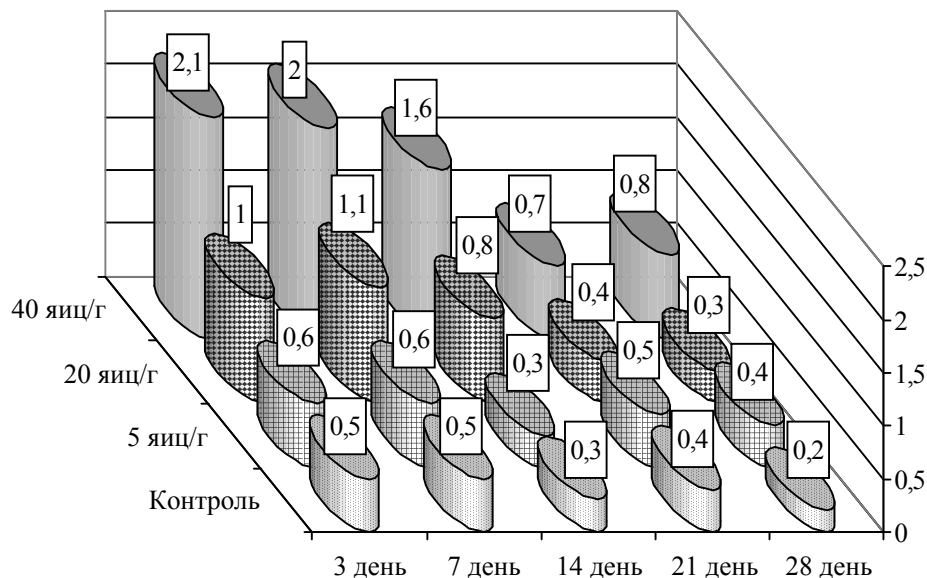


Рис. 2. Количество сперматогониев с микроядрами в семенниках мышей при экспериментальном гименолепидозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала и сроков наблюдения.

При дозе заражения 5 яиц/г показатели исследуемых клеток сперматогенеза с МЯ достоверно не превышали данные незараженных животных на протяжении всего эксперимента (рис. 2).

После увеличения дозы заражения до 20 яиц/г на 3 день опыта отмечался рост числа СГ с МЯ в 2 раза ($P < 0,05$) по сравнению с незараженными животными (рис. 2). К 7 дню число микроядеросодержащих СГ более чем в 2 раза, а СЦ в 2,5 раза достоверно превышало показатели интактного контроля. Уровень СГ с МЯ на 14 день эксперимента в 2,7 раза был выше, чем у контрольных мышей ($P < 0,05$). На 28 день количество микроядеросодержащих СТ более чем в 1,5 раза достоверно превышало показатели незараженных животных.

У мышей, зараженных в дозе 40 яиц/г массы тела, на 3 день наблюдения число микроядеросодержащих СГ достоверно превышало показатели интактных и зараженных в дозе 20 яиц/г животных в 4,2 и 2,1 раза соответственно (рис. 2). Количество СГ с МЯ на 7 день у опытных мышей в 4 раза и СЦ в 4,5 раза было выше, чем у контрольных. При сравнении данных пока-

показатели интактных и зараженных в дозе 20 яиц/г животных ($P < 0,01$). На 28 день отмечалось достоверное увеличение уровня СТ с МЯ в 3,5 раза по сравнению с интактным контролем и в 1,9 раза – с животными, зараженными в дозе 20 яиц/г.

При проведении хроматингетерогенного теста у незараженных животных II-ой группы процент сперматозоидов с одноцепочечной ДНК в течение опыта находился в пределах от 8,9+0,19 до 12,1+0,15 на 1000 клеток (рис. 3).

У мышей, зараженных в дозе 5 яиц/г, уровень сперматозоидов с одноцепочечной ДНК достоверно превышал на 7 и 21 дни наблюдения показатели интактных животных более чем в 1,5 раза (рис. 3).

При заражении мышей в дозе 20 яиц/г к 7 дню наблюдения число сперматозоидов с денатурированной ДНК в 2,8 и 1,6 раза соответственно достоверно превышали аналогичный показатель контрольных и зараженных в дозе 5 яиц/г животных (рис. 3). На 21 день отмечалось увеличение уровня сперматозоидов с одноцепочечной ДНК в 2,6 раза по сравнению с показателями контрольных мышей. Этот показатель

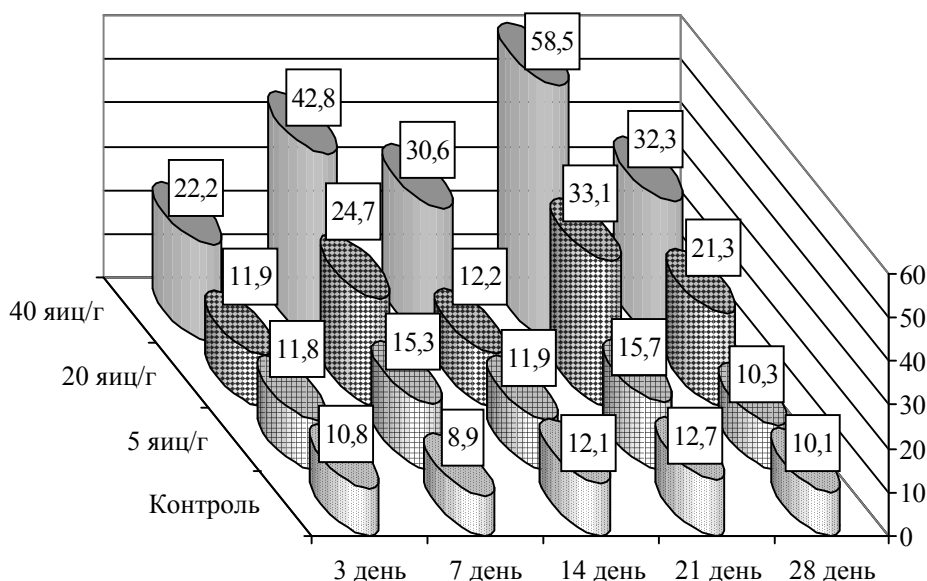


Рис. 3. Проценты сперматозоидов с одноцепочной молекулой ДНК в семенниках мышей при экспериментальном гименолепидозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала и сроков наблюдения.

был выше в 2,1 раза, чем у животных, зараженных в дозе 5 яиц/г ($P < 0,01$). К 28 дню количество половых клеток с поврежденной ДНК у опытных животных достоверно в 2,1 раза превышало данные интактного контроля.

У инвазированных животных в дозе 40 яиц/г на 3 день отмечалось достоверное увеличение числа сперматозоидов с одноцепочечной ДНК в 2,1 раза по сравнению с интактным контролем (рис. 3). К 7 дню эксперимента число сперматозоидов с денатурированной ДНК в 4,8 раза превышало уровень интактного контроля и в 1,7 раза – показатели мышей, зараженных в дозе 20 яиц/г ($P < 0,01$). На 14 день количество сперматозоидов с поврежденной молекулой ДНК было в 2,5 раза достоверно выше, чем у неинвазированных мышей. К 21 дню процент половых клеток с нарушенной ДНК достоверно в 4,6 и 1,8 раза соответственно превышал аналогичные показатели интактных и зараженных в дозе 20 яиц/г животных. Уровень сперматозоидов с одноцепочечной ДНК у мышей, зараженных в дозе 40 яиц/г, на 28 день был выше в 3,2 раза, чем в контрольной группе ($P < 0,01$). Это число достоверно в 1,5 раза превышало показатели животных, инвазированных в дозе 20 яиц/г массы тела.

Обсуждение

Установлено, что у мышей, зараженных в дозе 5 инвазионных яиц гименолеписов на 1 г

массы тела, число ПХЭ с МЯ на 3 и 14 дни и сперматозоидов с денатурированной молекулой ДНК на 7 и 21 дни от начала инвазии достоверно превышали показатели интактных животных.

При заражении мышей в дозе 20 яиц/г нами были получены результаты микроядерных тестов в костном мозге и семенниках, которые соответствовали данным исследований, проведенных нами ранее [3], а именно: количество микроядеросодержащих ПХЭ превышало уровень незараженных животных на 3, 7 и 14 дни, а число НХЭ с МЯ на 3 день ($P < 0,01$). Уровень ПХЭ с МЯ на 3 день наблюдения достоверно в 1,6 раза превышал показатель животных, зараженных в дозе 5 яиц/г. В семенниках отмечалось достоверное увеличение числа СГ с МЯ на 3, 7 и 14 дни, СЦ с МЯ на 7 день, а также микроядеросодержащих СТ к 28 дню эксперимента по сравнению с интактным контролем. При проведении хроматингетерогенного теста количество сперматозоидов с одноцепочечной ДНК превышало уровень незараженных животных на 7, 21 и 28 дни от начала инвазии ($P < 0,01$). Этот показатель достоверно был выше в 1,6 и 2,1 раза на 7 и 21 дни наблюдения соответственно по сравнению с данными мышей, зараженных в дозе 5 яиц/г.

У животных, инвазированных в дозе 40 яиц/г, число ПХЭ и НХЭ с МЯ на 3, 7 и 14 дни было выше по сравнению с незараженными

($P < 0,01$). При сравнении данных показателей мышей, зараженных в дозе 40 яиц/г, с инвазированными животными в дозе 20 яиц/г было установлено достоверное увеличение количества микроядродержащих ПХЭ в 1,5 - 1,8 раза на 3, 7 и 14 дни, а ПХЭ в 2,6 раза на 3 день от начала инвазии. В семенниках отмечалось увеличение числа СГ с МЯ на 3, 7 и 14 дни, СЦ с МЯ на 7 день и СТ с МЯ к 28 дню по сравнению с неинвазированными животными ($P < 0,01$). У мышей, зараженных в дозе 40 яиц/г, количество микроядер достоверно было выше в СГ в 1,8 - 2,1 раза на 3, 7 и 14 дни, СЦ в 1,8 раза на 7 день, СТ в 1,9 раза к 28 дню чем у инвазированных в дозе 20 яиц/г мышей. Количество сперматозоидов с денатурированной молекулой ДНК при дозе 40 яиц/г превышало показатели интактного контроля на протяжении всего эксперимента ($P < 0,01$). При сопоставлении данных мышей, зараженных в дозе 40 яиц/г, с уровнем животных, инвазированных в дозе 20 яиц/г, у первых отмечался достоверный рост в 1,5 - 1,8 раза сперматозоидов с поврежденной ДНК на 7, 21 и 28 дни.

Таким образом, метаболиты *Hymenolepis pana var. turis* обладают мутагенным воздействием как на соматические, так и на генеративные клетки сперматогенеза хозяина, которое приводит к росту числа микроядродержащих поли- и нормохроматофильных эритроцитов в костном мозге, сперматогониев, сперматоцитов, сперматид с микроядрами и сперматозоидов с одноцепочечной молекулой ДНК в семенниках у мышей линии СВА. Наиболее выраженные цитогенетические изменения у хозяина отмечаются в период высокой биологической активности паразитов и зависят от интенсивности инвазии.

Выводы

1. Гименолепидозная инвазия сопровождается синхронным повреждением наследственного аппарата соматических и генератив-

ных клеток сперматогенеза хозяина.

2. Уровень нарушений в геноме хозяина при экспериментальном гименолепидозе зависит от стадий развития паразита и максимально выражен на 3 и 14 дни инвазии.

3. Тяжесть цитогенетических повреждений в наследственном аппарате клеток хозяина связана с дозой введенного инвазионного материала при заражении и кратно достоверно возрастает при ее увеличении в линейной зависимости.

Литература

1. Бекиш В.Я., Поляржин В.В. Методика постановки микроядерного теста в семенниках мышей// Фунд. науки и достижения клин. медицины и фармации (Тез. докл. 58 науч. сессии ВГМУ). - Витебск, 2003. - С. 4 - 5.
2. Бекиш О.-Я.Л., Бекиш Вл.Я. Мутагенный эффект метаболитов мигрирующих личинок аскарид (*Ascaris suum*)// Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі (Сер. біял. навук). - № 2. - 2000. - С. 109-113.
3. Бекиш О.-Я.Л., Бекиш Вл.Я., Поляржин В.В., Колмогоров В.И. Нарушения в генетическом аппарате соматических и генеративных клеток хозяина, вызванные метаболитами гельминтов// Вести НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. News of biomedical science. - 2001. - №2. - С. 70-74.
4. Калинин Л.В., Бекиш О.-Я.Л. Оценка мутагенной активности трихинеллезной инвазии с помощью цитогенетических тестов// Тез. докл. межд. науч. конф. "Актуал. пробл. мед. и вет. паразитологии". - Витебск. - 1993. - С. 11-12.
5. Поляржин В.В. Метаболиты *Hymenolepis pana* как мутагены соматических клеток хозяина // Вопросы экспериментальной биологии и медицины: Сб. науч. трудов ВГМУ. - Витебск, 1999. - С. 73 - 77.
6. Поляржин В.В., Бекиш О.-Я.Л. Экспериментальная модель воспроизведения гименолепидоза// Совр. паразитология: пробл. и перспективы (Тр. конф., посвящ. 65-летию каф. мед. биол. и общей генетики). - Витебск. - 1999. - С. 34-36.
7. Сексология и андрология/ Под. ред. Возианова А.Ф., Горпиченко И.И.. - Абрис. - Киев. - 1997. - С. 713-714.
8. Степанов А.В. Характеристика наследственного аппарата хозяина при трихоцефалезной инвазии// XI конф. Украинского общества паразитологов. (Тез. докл.). - Киев. - 1993. - С. 156.
9. Schmid W. The micronucleus test// Mutat. Res. - 1975. - Vol. 31, №1 - P. 9-16.

Поступила 24.09.2003 г.

Принята в печать 26.12.2003 г.