

УДК 616-002.95-08

ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК И АПОПТОЗ КЛЕТОК ХОЗЯИНА ДО И ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ ИНВАЗИИ ШИРОКИМ ЛЕНТЕЦОМ

Зорина В.В., Бекиш В.Я.

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

*Инвазия паразитами *Diphyllobothrium latum* у золотистых хомяков сопровождается генотоксическим эффектом в соматических клетках хозяина, который характеризуется ростом количества одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК клеток костного мозга до 7,1 %. Инвазия широким лентецом у человека вызывает генотоксический и цитотоксический эффекты в лимфоцитах периферической крови пациентов. Лечение пациентов с дифиллоботриозом празиквантелом, индометацином, витаминным антиоксидантным комплексом с Se и пищеварительным ферментным препаратом, содержащим липазу, амилазу, протеазы, является оптимальным, так как приводит к полной дегельминтизации, отсутствию клинических проявлений инвазии и защищает геном пациентов от генотоксического и цитотоксического воздействий секреторно-экскреторно-соматических продуктов паразитов.*

*Invasion of hamsters by *Diphyllobothrium latum* parasites 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 %. Invasion of human by fish tapeworm is going with genotoxic and cytotoxic effects of lymphocytes DNA of peripheral blood. Treatment of patients with diphyllobothriosis by praziquantel in combination with indometacin and complex of antioxidant vitamin complex with selenium and digestive ferment drug lipase, amylase, protease containing use is an optimal because leads to full dehelminthization, absence of clinical appearance of invasion and protect genome of patient from genotoxic and cytotoxic influences of secretor-exretor-somatic products of parasites.*

Ключевые слова: широкий лентец, хомяки, щелочной гель-электрофорез изолированных клеток, терапия дифиллоботриоза.

Keywords: fish tapeworm, hamsters, single cell gel electrophoresis, therapy of diphyllobothriosis.

Введение. Дифиллоботриоз вызывается широким лентецом (*Diphyllobothrium latum*), который вызывает инвазию, имеющую значение для здравоохранения, поскольку паразит нарушает функцию желудочно-кишечного тракта, а также способен поглощать витамин В₁₂ и нарушать эритропоэз у пациентов. Человек заражается при употреблении в пищу слабо прожаренной рыбы или свежеприготовленной икры. Человек является для паразита окончательным хозяином и источником инвазии для щуки, окуня, ерша, судака и других хищных рыб.

Для специфической терапии дифиллоботриоза используют фенасал (йомезан, никлозамид), празиквантел [1]. При отсутствии этих препаратов рекомендуется использовать неочищенные семена тыквы. Эффективность фенасала не превышает 70 %. Для лечения дифиллоботриоза празиквантел назначают в дозе 20-25 мг/кг однократно и эффективность монотерапии им составляет 85-90 % [1].

Патогенное действие широкого лентеца на организм человека обусловлено механическим воздействием на слизистую кишечника, нейрорефлекторным влиянием, аллергическими реакциями, а также развитием эндогенного гипо- и авитаминоза В₁₂, угнетением биосинтеза фолиевой кислоты и снижением уровней витаминов антиоксидантного характера действия [3]. Все эти процессы протекают на фоне нарушенных функций со стороны иммунной системы и сопровождаются снижением общей реактивности организма [1]. Целесообразно при терапии кишечных цестодозов применение неспецифических противовоспалительных препаратов (индометацин, ибупрофен), которые снижают аллергические осложнения заболеваний и обладают антимуtagenным действием, защищая геном пациента [8, 10]. Антимуtagenное действие индометацина, ибупрофена связано, в первую очередь, с их способностью снижать в месте воспаления концентрации простагландинов, брадикинина, эндогенных пирогенов, активных форм кислорода, монооксида азота, других биологически активных веществ [5].

Цель исследования – изучить возможные генотоксические и цитотоксические эффекты в клетках хозяина при дифиллоботриозе и обосновать новый способ лечения инвазии, направленный на защиту генома хозяина, а также достижение полного выздоровления пациента.

Материал и методы исследований. Экспериментальные исследования были проведены на 40 золотистых хомяках-самцах массой 45-60 г., клиническое обоснование комбинированной терапии проводилось на базе Витебской областной инфекционной больницы. Были проведены 2 серии исследований: 1-я – на подопытных животных, 2-я – на пациентах с дифиллоботриозом и донорах крови.

В первой серии исследования проводились на подопытных животных, которые были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой: первая (негативный контроль), вторая – чистая инвазия, третья – терапия инвазии празиквантелом; четвертая – терапия инвазии празиквантелом, индометацином и витаминным антиоксидантным комплексом с Se. Всех животных второй, третьей и четвертой групп заражали внутрижелудочно в дозе 10 плероцеркоидов на животное [2]. Для повышения вероятности приживления и способствованию более длительного паразитирования широких лентецов 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 [2]. При проведении сочетанной терапии использовались следующие дозировки препаратов: празиквантел – однократно в дозе 25 мг/кг, индометацин – трёхкратно в дозе 2,14 мг/кг; витамины трёхкратно в дозировках β-каротин – 6 мг/кг, токоферола ацетата – 80 мг/кг, аскорбиновой кислоты – 200 мг/кг,

Se – 20 мкг/кг. Все препараты разводились до требуемых концентраций 2 % раствором крахмального геля и вводились животным внутривентрально.

Животные были пролечены на имагинальной стадии инвазии с 17-го по 19-й дни от заражения празиквантелом или празиквантелом с индометацином и витаминным антиоксидантным комплексом с Se. Проводили щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод “ДНК-комет”) костного мозга и семенников по N.P.Singh et al. [9] в модификации B.Hellman et al. [7] и нашими изменениями [4]. Повреждения молекулы ДНК определяли при помощи автоматической программы “CASP v. 1.2.2” [6]. В качестве основного международно принятого показателя генотоксического воздействия факторов среды при проведении метода “ДНК-комет” использовали “момент хвоста” (“длина хвоста”, умноженная программой на процент ДНК в “хвосте кометы”). Для оценки цитотоксического воздействия в 100 случайно выбранных клетках определяли процент апоптотических, изображения которых характеризуют минимальные размеры ядра и большой хвост, разбросанный во все стороны. Для оценки эффективности терапии инвазии проводился подсчет количества паразитов в тонком кишечнике на 20-й день инвазии.

Во второй серии разрабатывали комбинированный способ терапии дифиллоботриоза человека празиквантелом с индометацином и витаминным антиоксидантным комплексом, содержащим витамины С, Е, β-каротин с Se. Под наблюдением находилось 20 пациентов с дифиллоботриозом (10 женщин и 10 мужчин) в возрасте от 20 до 50 лет. Для лечения дифиллоботриоза были использованы следующие препараты: празиквантел в таблетках по 600 мг, индометацин в таблетках по 25 мг, витаминный антиоксидантный комплекс с Se, в таблетке которого содержалось 100 мг витамина С, 30 мг витамина Е, 6 мг β-каротина и 30 мкг селена; пищеварительный ферментный препарат, содержащий липазу, амилазу, протеазы в драже.

Пациенты с дифиллоботриозом были разделены на три подгруппы. Первая подгруппа включала 8 человек, которые не получали лечения, вторая – 4 человека, пролеченных празиквантелом, третья подгруппа – 8 пациентов, получавших сочетанную терапию празиквантелом (однократно из расчета 25 мг/кг массы тела в три приема с интервалом в 6 часов, курс лечения – 1 день) с индометацином (25 мг 3 раза в день), витаминным антиоксидантным комплексом с Se (1 капсула в день) и пищеварительным ферментным препаратом (2 драже 3 раза в сутки). Витаминный антиоксидантный комплекс с Se и пищеварительный ферментный препарат назначали совместно с индометацином в течение 3 дней. Витамин В₁₂ назначали только одной пациентке с тяжелой формой анемии. Для оценки эффективности защиты генома соматических клеток пациентов от воздействия секреторно-эксcretорно-соматических продуктов широкого лентеца применяли метод “ДНК-комет” лимфоцитов периферической крови пациентов [4]. В качестве негативного контроля использовали данные метода “ДНК-комет” лимфоцитов 10 доноров крови. Статистическая обработка полученных цифровых данных производилась с использованием программы Excel 2010. Просчитывались средняя арифметическая и стандартное отклонение средней арифметической (M±SD). Достоверность выявляемых различий определяли по t-критерию Стьюдента. Полученные результаты считались достоверными при P<0,01-0,05.

Результаты исследований. При проведении метода “ДНК-комет” в клетках костного мозга золотистых хомяков группы интактного контроля показатель “длины хвостов” комет составил $4,10 \pm 0,89$, процент ДНК в “хвостах комет” – $1,78 \pm 0,55$, “момент хвоста” – $0,08 \pm 0,04$, а процент апоптотических клеток был $2,80 \pm 0,35$. В клетках семенников контрольных животных показатели генотоксичности (длина “хвостов комет” (в пикселях) и процент ДНК в “хвостах комет”) составили $7,92 \pm 1,56$ и $1,85 \pm 0,77$ соответственно. Показатель “момента 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 $15,34 \pm 2,18$, что достоверно превысило контрольный показатель в 3,7 раза (таблица 1). Процент ДНК в “хвостах комет” и “момент хвоста” в клетках костного мозга были выше в 3,98 и 14,9 раз соответственно контрольных уровней. Процент апоптотических клеток не отличался от данных интактного контроля. Все показатели генотоксичности и основной показатель цитотоксичности в клетках семенников не отличались от показателей животных негативного контроля (таблица 2). Количество половозрелых паразитов в тонком кишечнике составило $2,8 \pm 0,5$ экземпляров.

Таблица 1 - Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток в костном мозге золотистых хомяков до и после комбинированной терапии дифиллоботриоза

Исследуемый показатель / группа животных	Длина “хвостов комет” (в пикселях)	Процент ДНК в “хвостах комет”	“Момент хвоста”	Процент апоптотических клеток
Негативный контроль	$4,10 \pm 0,89$	$1,78 \pm 0,55$	$0,08 \pm 0,04$	$2,80 \pm 0,35$
Чистая инвазия	$15,34 \pm 2,18^*$	$7,10 \pm 1,36^*$	$1,09 \pm 0,56^*$	$2,60 \pm 0,58$
Инвазия + празиквантел	$15,47 \pm 2,19^*$	$3,03 \pm 0,76^{*\odot}$	$0,51 \pm 0,11^*$	$2,60 \pm 0,46$
Инвазия + празиквантел + индометацин + комплекс витаминов с Se	$6,23 \pm 1,12^{\odot}$	$1,45 \pm 0,12^{\odot}$	$0,09 \pm 0,06^{\odot}$	$2,80 \pm 0,13$

Примечание: * - достоверное отличие от данных негативного контроля, \odot - от данных чистой инвазии при P<0,01-0,05

У инвазированных широким лентецом золотистых хомяков, получавших терапию празиквантелом на имагинальной стадии развития паразитов в клетках костного мозга, показатель длины “хвостов комет” достоверно превысил контрольный в 3,7 раза (таблица 1). Процент ДНК в “хвостах комет” возрос в 1,7 раза по отношению к контрольному, а к показателю чистой инвазии снизился в 2,3 раза. Основной показатель генотоксичности (“момент хвоста” комет) достоверно был выше в 6,4 раза по отношению к данным интактного контроля и не отличался от данных чистой инвазии. Процент апоптотических клеток в костном мозге достоверно не изменялся. В клетках семенников животных при лечении одним антигельминтиком все

показатели генотоксичности и цитотоксичности не отличались от показателей интактного контроля. Число паразитов в кишечнике уменьшилось и составило в среднем $0,6 \pm 0,35$ на животное.

Таблица 2 - Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток в семенниках золотистых хомяков до и после комбинированной терапии дифиллоботриоза

Исследуемый показатель / группа животных	Длина "хвостов комет" (в пикселях)	Процент ДНК в "хвостах комет"	"Момент хвоста"	Процент апоптотических клеток
Негативный контроль	$7,92 \pm 1,56$	$1,85 \pm 0,77$	$0,16 \pm 0,09$	$3,40 \pm 0,90$
Чистая инвазия	$7,92 \pm 0,86$	$1,84 \pm 0,69$	$0,18 \pm 0,06$	$3,40 \pm 0,34$
Инвазия + празиквантел	$8,67 \pm 1,44$	$1,89 \pm 1,57$	$0,19 \pm 0,07$	$2,40 \pm 0,74$
Инвазия + празиквантел + индометацин + комплекс витаминов с Se	$12,34 \pm 0,91^*$	$1,38 \pm 0,34$	$0,19 \pm 0,09$	$3,60 \pm 0,94$

Примечание: * - достоверное отличие от данных негативного контроля, @ - от данных чистой инвазии при $P < 0,01-0,05$

При проведении терапии дифиллоботриоза у золотистых хомяков празиквантелом в сочетании с индометацином и комплексом витаминов с Se выявило достоверные изменения по показателям генотоксичности. Так, показатель длины "хвостов комет" достоверно не отличался от контрольного и в 2,5 раза был ниже показателя чистой инвазии. Процент ДНК в "хвостах комет" был достоверно ниже значения чистой инвазии в 4,9 раза и не отличался от данных негативного контроля. Значение "момента хвоста" клеток костного мозга золотистых хомяков достоверно не отличалось от данного показателя у контрольных животных, но в то же время в 12,1 раза было ниже по сравнению с данными чистой инвазии. Процент апоптотических клеток достоверно не изменялся. В генеративных клетках хомяков-самцов при комбинированной терапии только показатель длины "хвостов комет" достоверно превысил контрольный в 1,5 раза (таблица 2). Процент ДНК в "хвостах комет", "момент хвоста" клеток семенников и процент апоптотических клеток не отличались от данных интактного контроля. После проведенной терапии на 20-й день эксперимента у хомяков данной подгруппы паразитов в кишечнике обнаружено не было.

При проведении метода "ДНК-комет" в клетках периферической крови доноров были получены следующие результаты: "длина хвостов" комет составила $3,73 \pm 1,48$, процент ДНК в "хвостах комет" – $1,59 \pm 0,55$, "момент хвоста" – $0,11 \pm 0,04$, процент апоптотических клеток – $0,36 \pm 0,50$.

Во время исследования периферической крови пациентов до лечения, методом "ДНК-комет" было установлено, что все исследуемые показатели достоверно отличались и были выше данных негативного контроля (таблица 3). Так, показатель длины "хвостов комет" достоверно возрос в 5,1 раза. Процент ДНК в "хвостах комет" превысил контрольный показатель в 5 раз. Основной показатель генотоксичности ("момент хвоста"), возрос в 15,4 раза по сравнению с данными доноров крови. Показатель цитотоксичности возрос в сравнении с данными доноров крови в 9,4 раза.

Таблица 3 - Показатели щелочного гель-электрофореза изолированных клеток лимфоцитов периферической крови пациентов с дифиллоботриозом до и после комбинированного лечения

Исследуемый показатель / группа пациентов	Длина "хвостов комет" (в пикселях)	Процент ДНК в "хвостах комет"	"Момент хвоста"	Процент апоптотических клеток
Негативный контроль – доноры крови (n=10)	$3,73 \pm 1,48$	$1,59 \pm 0,55$	$0,11 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,50$
Дифиллоботриоз до лечения (n=8)	$19,21 \pm 3,19^*$	$8,02 \pm 0,96^*$	$1,69 \pm 0,38^*$	$3,40 \pm 0,59^*$
Дифиллоботриоз, терапия празиквантелом (n=4)	$17,78 \pm 2,97^*$	$8,56 \pm 0,81^*$	$1,43 \pm 0,17^*$	$1,00 \pm 0,42^@$
Дифиллоботриоз, терапия празиквантелом с индометацином, комплексом витаминов с Se и пищеварительным ферментным препаратом (n=8)	$3,82 \pm 0,76^@$	$1,48 \pm 1,91^@$	$0,12 \pm 0,05^@$	$0,50 \pm 0,53^@$

Примечание: * - достоверное отличие от данных доноров крови, @ - от данных до лечения при $P < 0,01-0,05$

При лечении дифиллоботриоза у людей только празиквантелом, положительный результат отмечался в трех из четырех случаев. У одного пациента на 30-й день сохранялись жалобы на слабость, урчание в животе, понос, в фекалиях обнаруживались яйца широкого лентеца. У пациентов, пролеченных только празиквантелом, при использовании метода "ДНК-комет", все исследуемые показатели генотоксичности достоверно отличались от контрольных уровней. Так, показатель длины "хвостов комет" (в пикселях) превышал контрольный уровень в 4,8 раза. Процент ДНК в "хвостах комет" был в 5,4 раза выше контрольного уровня. Основной показатель генотоксичности в лимфоцитах периферической крови не отличался от данных, полученных до лечения, но в то же время в 13 раз превышал контрольный показатель (таблица 3). Уровень апоптотических клеток был ниже в 3,4 раза, чем до лечения, и не отличался от данных контрольной группы.

У пациентов с дифиллоботриозом, получавших празиквантел, индометацин, комплекс витаминов-антиоксидантов с Se и пищеварительным ферментным препаратом, на 30-й день жалоб не было, в фекалиях яйца *D. latum* не обнаруживались. При оценке данных, полученных при использовании метода «ДНК-комет», было установлено, что длина «хвостов комет» не отличалась от показателя доноров крови и в 4,6 раза снизилась по сравнению с данными до лечения (таблица 3). Процент ДНК в «хвостах комет» также достоверно не изменялся в сравнении с контрольными значениями и в 5,4 раза был ниже, чем этот показатель до лечения. Отмечалось также снижение «момента хвоста» лимфоцитов периферической крови в 8,9 раза по сравнению с данными до лечения, и этот показатель не превышал контрольный уровень. Уровень апоптотических клеток не отличался от показателей доноров крови и достоверно в 6,8 раз был меньше, чем до лечения.

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

Исследование влияния терапии экспериментального дифиллоботриоза показало, что однократное применение празиквантела на имагинальной стадии развития паразитов не может полностью защитить геном соматических клеток хозяина от генотоксического воздействия секреторно-эксcretорно-соматических продуктов широкого лентеца. Это подтверждалось сохранением высоких уровней «момента хвоста» клеток костного мозга, а также сохранением половозрелых паразитов в тонком кишечнике зараженных животных.

Назначение празиквантела с индометацином в комбинации с комплексом витаминов с Se на имагинальной стадии развития паразитов оказалось эффективным способом защиты генома хозяина по сравнению с лечением только антигельминтиком. Назначение празиквантела с индометацином в комбинации с комплексом витаминов с Se приводит к интенсивному снижению «момента хвоста» клеток костного мозга до показателей интактного контроля. Кроме того, у зараженных животных, получавших эту комбинацию препаратов, было отмечено отсутствие паразитов в кишечнике по сравнению с инвазированными нелечеными животными.

Инвазия широким лентецом у человека сопровождается генотоксическим и цитотоксическим эффектами в лимфоцитах периферической крови пациентов, которые характеризуются ростом количества одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК до 8 % и апоптотических клеток до 3,4 %. Лечение пациентов с дифиллоботриозом празиквантелом, индометацином и витаминным антиоксидантным комплексом с Se и пищеварительным ферментным препаратом, содержащим липазу, амилазу, протеазу, является оптимальным, так как приводит к полной дегельминтизации, отсутствию клинических проявлений инвазии и защищает геном больного от генотоксического и цитотоксического воздействий секреторно-эксcretорно-соматических продуктов *D. latum*. На основании проведенных экспериментальных и клинических исследований, проведенных в рамках темы задания ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» 03.05 «Изучить эпидемиологическую ситуацию по цестодозам в отдельных регионах Беларуси, предложить способы их профилактики и лечения», нами разработаны и утверждены Министерством здравоохранения инструкция по применению «Комбинированный способ лечения дифиллоботриоза» и протокол обследования и лечения пациентов с дифиллоботриозом (Per. № 096-1008).

Литература. 1. Авдюхина, Т.И. Дифиллоботриозы / Т.И. Авдюхина // *Клиническая паразитология* / А.Я. Лысенко [и др.]; под ред. А.Я. Лысенко. – Женева, 2002. – Ч. 2. – С. 439–446. 2. Астафьев Б.А. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине / Б.А. Астафьев, Л.С. Яроцкий М.Н. Лебедева. – М.: Наука, 1989. – 279 с. 3. Влияние жизнедеятельности гельминтов на метаболизм витаминов в организме их хозяев / О.-Я.Л. Бекиш [и др.] // *Вестник ВГМУ*. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 86–92. 4. Дурнев А.Д. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений / Дурнев А.Д. и др. // *Методические рекомендации. Утв. РАМН и РАСН*. – М., 2006. – 27 с. 5. *Справочник Видаль. Лекарственные препараты в Беларуси: Справочник*. – М.: АстраФармСервис. – 2007. – С. 269–270; 838–839. 6. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay / K. Kořica [et al] // *Mutat. Res. Genetic Toxicol. and Envir. Mutagenesis*. – 2003. – Vol. 534. – P. 15–20. 7. Hellman, B. Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers / B. Hellman, H. Vaghef, L. Friis, C. Edling // *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. – 1997. – Vol. 69. – P. 185–192. 8. Lee Se-Hoon, Hannu N. Effects of indomethacin and arachidonic acid on sister chromatid exchange induction by styrene and styrene-7,8-oxide // *Mutat. Res. Lett*. – 1995. – Vol. 348, № 4. – P. 175–181. 9. Singh, N. A Simple Technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells / N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E. Schneider // *Exp. Cell Research*. – 1988. – Vol. 175. – P. 184–191. 10. Suzuki Y. [et al] Effect of indometacin on the micronucleus test of mice // *Mutat. Res. Environ. Mutagenesis and Related. Subj.* – 1988. – Vol. 203, № 5. – P. 388–392.

Статья передана в печать 24.03.2015 г.

УДК 636.5-053.087.8

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКА «КЛОСТАТ™ СУХОЙ» В БРОЙЛЕРНОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ

Капитонова Е.А., Мехова О.С.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Применение пробиотика «КлоСТАТ™ сухой» в рационах цыплят-бройлеров способствует повышению среднесуточных приростов на 1,6%, сохранности поголовья на 2,6 п.п. и снижению затрат корма на единицу продукции на 6,2%. Пробиотик «КлоСТАТ™ сухой» оказывает стимулирующее действие на формирование лакто- и бифидофлоры в желудочно-кишечном тракте, угнетает условно-патогенную