

УДК 619:615.3:616.33-008.3:636.22/28.053.2

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВОГО СЕКРЕТОРНО-ЭКСКРЕТОРНО-СОМАТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА ЛИЧИНОК ТРИХИНЕЛЛ НА НАСЛЕДСТВЕННЫЙ АППАРАТ КЛЕТОК САМОК КРЫС И ИХ ЭМБРИОНОВ**Пашинская Е.С.**УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
г. Витебск, Беларусь

Белковый секреторно-экскреторно-соматический продукт трихинелл обладает эмбриотоксическим воздействием при внутрибрюшинном введении на всех периодах эмбрионального развития крыс, которое характеризуется повышением постимплантационной гибели в 6,4-10 раз. Эмбриотоксический эффект трихинелл на стадии раннего органогенеза сопровождается понижением средней массы эмбрионов в 1,5 раза и уменьшением среднего краниокаудального размера в 1,3 раза, а на стадии позднего органогенеза увеличением средней массы эмбрионов в 2,69 раз и среднего краниокаудального размера в 1,19 раза.

При применении метода ДНК-комет установлено, что введение белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта трихинелл сопровождается генотоксическим и цитотоксическим эффектами в соматических клетках костного мозга самок и их эмбрионов на стадиях раннего и позднего органогенеза, а так же в плодном периоде. Это показывает увеличение количества одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК в 2,12-7,5 раз и числа апоптотических клеток в 2,63-10,4 раза.

The protein secretory-excretory-somatic product of Trichinella spiralis possesses embryotoxic influence at intraperitoneal introduction on all periods of development of rats which is characterized by increase postimplantation death in 6,4-10 times. The embryotoxic effect of Trichinella spiralis at a stage early organogenesis is accompanied by decrease of average mass of embryo's in 1,5 times and decrease of average cranyocaudal size in 1,3 times and at a stage late organogenesis a increase of average mass of embryo's in 2,69 times and average cranyocaudal size in 1,19 times.

At application of a method of DNA-comets it is established that introduction of an protein secretory-excretory-somatic product of Trichinella spiralis is accompanied genotoxic and cytotoxic effects in somatic cells of a bone marrow of females and their embryos at stages early and late organogenesis and as in the fetal period. It shows increase of quantity of one-chained ruptures and alkaline-labile sites of nuclear DNA in 2,12-7,5 times and numbers of apoptotic cells in 2,63-10,4 times.

Введение. Взаимоотношения в системе паразит-хозяин при тканевых личиночных гельминтозах осуществляются на различных уровнях организации. В них участвуют различные формы адаптации паразита. Показано, что тканевые личинки гельминтов выделяют в составе секреторно-экскреторных продуктов комплекс биологически активных веществ, воздействия которых на организм хозяина вызывают ряд значительных изменений [2]. Повреждения наследственного аппарата, вызываемые мутагенами, могут служить причиной невынашивания беременности, задержки умственного развития, бесплодия, возникновения пороков физического развития у человека. Для Республики Беларусь эта проблема весьма актуальна. Ежегодно рождается около 3500 тысяч детей с наследственными и врожденными патологиями, причины которых не всегда понятны.

Ранее В.Я. Бекишем и соавт. было выяснено, что сенсбилизация белковым соматическим продуктом из тканей гельминтов сопровождается кластогенным и анеугенным эффектами, индуцируя повреждения в соматических клетках костного мозга хозяина, а так же вызывает повреждение генома генеративных клеток в семенниках животных [1]. Позже нами было установлено, что секреторно-экскреторные продукты трихинелл обладают генотоксическим и цитотоксическим эффектами на соматические клетки костного мозга самок мышевидных грызунов и их эмбрионов. Однако влияние белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта личинок *Trichinella spiralis* при внутрибрюшинном введении во время беременности самок крыс линии Wistar ранее не изучалось.

Цель исследования – изучить возможные генотоксический, цитотоксический, эмбриотоксический и фетотоксический эффекты белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта личинок *Trichinella spiralis* на наследственный аппарат соматических клеток самок крыс линии Wistar и их эмбрионов при различных стадиях внутриутробного развития.

Материал и методы исследований. Исследования проводились на 40 самках и 8 самцах крыс линии Wistar массой 250 г в возрасте 4 месяца. Животные содержались в клетках в соотношении 5 самок к 1 самцу на протяжении 24 часов в условиях вивария. Наступление беременности у животных определялось по наличию сперматозоидов в мазке из влагалища и гиперемии наружных половых органов. Беременные самки были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой. Получение белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта (БЭСЭП) из личинок *T. spiralis* проводилось по методу О.-Я.Л. Бекиша (1982). Стерилизацию продукта осуществляли посредством пропускания через бактерицидные капроновые фильтры с размером поры 0,45 мкм, а определение белка выполняли биуретовым методом.

Крысам 1-ой (контрольной) группы вводили внутрибрюшинно 0,9 % стерильный раствор хлорида натрия в объеме 0,5 мл на ранней, поздней стадии органогенеза и плодном периоде развития эмбрионов. Крыс 2-ой группы инъецировали внутрибрюшинно БЭСЭП личинок *T. spiralis* в суточной дозе 50 мкг/г массы тела животного с 5-го по 8-ой дни беременности (ранняя стадия органогенеза), самок 3-ей группы – с 9-го по 12-ый дни (поздняя стадия органогенеза), животных 4-ой группы – с 13-го по 16-ый дни беременности (плодный период). На 19-ый день беременности крыс умерщвляли под эфирным наркозом, после чего производили выделение матки с эмбрионами и бедренных костей. Получение клеточных суспензий из эмбрионов и костного мозга крыс проводили по разработанному нами методу [5].

Эмбриотоксические изменения определяли с учетом рекомендаций Б.И. Любимова и соавт. [4], Р.У. Хабриева и соавт. [6] по экспериментальному (доклиническому) изучению репродуктивной токсичности новых фармакологических веществ. После выделения маток у беременных самок подсчитывали количество желтых тел, мест имплантации, общее количество эмбрионов, число живых и мертвых эмбрионов, количество резорбций, среднюю массу эмбрионов в помете и краниокаудальный размер с помощью бинокулярной лупы МБС 10 и электронных весов Adventurer Pro AV264. Основными показателями эмбриотоксичности считали

предимплантационную смертность (разность между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантаций в матке) и постимплантационную гибель (разность между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов).

Для изучения возможных генотоксических и цитотоксических нарушений в соматических клетках самок и их эмбрионов использовали щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод «ДНК-комет») по N.P. Singh et al., модифицированный B. Heiiman et al. и нами. Повреждения молекул ДНК определяли при помощи автоматической программы «CASP v. 1.2.2». В полученных микропрепаратах подсчитывалось по 50 клеток, в каждой из которых учитывались следующие показатели генотоксичности: «длина хвоста кометы» в пикселях; процент ДНК в «хвосте кометы»; «момент хвоста», вычисленный программой из «длины хвоста», умноженной на процент ДНК в «хвосте кометы». Для оценки цитотоксического воздействия секреторно-эксcretорных продуктов трихинелл из 100 случайно выбранных клетках костного мозга и эмбрионов определяли процент апоптотических, имеющих минимальные размеры ядра и большой разбросанный во все стороны «хвост кометы». Результаты обрабатывались статистически с использованием программы Excel 2002. Рассчитывали среднюю арифметическую и ее стандартное отклонение ($M \pm SD$). Достоверность выявленных различий определяли по t-критерию Стьюдента. Полученные данные от сенсibilизированных самок и их эмбрионов сравнивались с показателями контрольной группы.

Результаты исследований. В контрольной группе животных количество желтых тел в среднем составило $9,30 \pm 1,57$, мест имплантации – $9,00 \pm 1,6$, общее количество эмбрионов – $8,70 \pm 1,89$, количество живых эмбрионов – $8,70 \pm 1,89$, количество резорбций – $0,06 \pm 0,70$. Средняя масса эмбрионов в помете составила $1,83 \pm 0,37$, а средний краниокаудальный размер – $30,50 \pm 2,95$. Показатель предимплантационной гибели находился на уровне 3,2 %, а постимплантационной – 3,3 %.

У самок 2-ой группы, инъецированных БСЭСР с 5-го по 8-ой дни беременности (стадия раннего органогенеза), отмечалось снижение количества живых эмбрионов в 1,4 раза, число мертвых эмбрионов в среднем составило $0,90 \pm 1,10$. Средняя масса эмбрионов уменьшилась в 1,5 раза, средний краниокаудальный размер в 1,3 раза по отношению к контрольным показателям. Постимплантационная гибель превысила контрольный уровень в 6,4 раза. У животных 3-ей группы, подвергшихся инъекции БСЭСР с 9-го по 12-ый дни беременности (стадия позднего органогенеза), количество мертвых эмбрионов составило $2,90 \pm 2,92$, что достоверно превышало данные контроля. Средняя масса эмбрионов увеличилась в 4 раза, краниокаудальный размер – в 1,19 раза. Постимплантационная гибель составила 33,33%, что в 10 раз больше контрольного уровня. Кроме того, у крыс 3-ей группы отмечалось наличие внутриматочных кровоизлияний, плацента имела зеленовато-серый оттенок, а околоплодные воды – вязкую консистенцию. Большинство извлеченных эмбрионов были гиперплазированы, у них наблюдались кровоизлияния. У крыс 4-ой группы, после введения БСЭСР с 13-го по 15-ый дни беременности (плодный период), возросло количество мертвых эмбрионов до $2,90 \pm 2,85$. Постимплантационная гибель составила 28,71%, что в 8,7 раза превысило контрольные данные.

Результаты метода ДНК-комет контрольной группы показали, что в костном мозге самок «длина хвостов комет» (в пикселях) составила $3,32 \pm 0,16$, процент ДНК в «хвостах комет» – $0,50 \pm 0,08$, «момент хвоста» – $0,02 \pm 0,01$, процент апоптотических клеток – $1,00 \pm 1,05$.

При оценке показателей 2-ой группы самок, инъецированных БСЭСР личинок *T. spiralis* с 5-го по 8-ой дни беременности (ранняя стадия органогенеза), полученных с применением метода ДНК-комет, установлено, что все данные генотоксичности и цитотоксичности в клетках костного мозга достоверно превышали контрольные величины. Так «длина хвостов комет» (в пикселях) была в 2,3 раза выше контрольного показателя; процент ДНК в «хвостах комет» – в 6,5 раза; «момент хвоста» – в 3,6 раза; число апоптотических клеток – в 7,2 раза. При исследовании костного мозга 3-ей группы животных после введения БСЭСР личинок *T. spiralis* с 9-го по 12-ый дни (поздняя стадия органогенеза) было установлено, что «длина хвостов комет» (в пикселях) превысила контрольные показатели в 1,9 раза, «момент хвоста» – в 6,5 раза, процент апоптотических клеток – в 7,2 раза. Показатели 4-ой группы животных подвергшихся инъекциям БСЭСР с 13-го по 16-ый дни беременности (плодный период) достоверно отличались от контрольных. Так «длина хвостов комет» была выше в 2,09 раза, «момент хвоста» комет увеличился в 5,5 раз; число апоптотических клеток в 10,4 раза.

В контрольной группе животных в эмбриональных клетках «длина хвостов комет» (в пикселях) составила $3,34 \pm 0,15$, процент ДНК в «хвостах комет» – $0,47 \pm 0,11$, «момент хвоста» – $0,02 \pm 0,01$, а процент апоптотических клеток – $1,90 \pm 1,85$.

В клетках эмбрионов животных 2-ой группы «длина хвостов комет» и процент ДНК в «хвостах комет» превышали уровень контроля в 2 и 7,5 раза; «момент хвоста» комет увеличился в 11 раз, а число апоптотических клеток в 8 раз соответственно по отношению к контрольным данным. В клетках эмбрионов крыс 3-ей группы «длина хвостов комет» превысила контроль в 1,8 раз, процент ДНК в «хвостах комет» в – 2,12 раза, «момент хвоста» комет – в 3,5 раз, число апоптотических клеток – в 2,63 раза. У эмбрионов самок 4-ой группы все показатели генотоксичности и цитотоксичности превышали контрольные показатели. Так длина «хвостов комет» увеличилась в 2,26 раза, «момент хвоста» – в 11,4 раза, число апоптотических клеток – в 4,52 раза по отношению к контролю.

Заключение. На основании вышеизложенного можно заключить, что внутрибрюшинное введение БСЭСР личинок *T. spiralis* самкам крыс линии Wistar на различных сроках беременности приводит к возникновению гено-, цито- и эмбриотоксического эффекта.

Наши данные согласуются с Мак С.Н. и соавт., которые выяснили, что секреторно-эксcretорных продуктах *T. spiralis* и *Trichinella pseudospiralis* имеется одноцепочечная внеклеточная эндонуклеаза, которая гидролизует ДНК и РНК лимфоцитов человека [8], а также ДНК - оплетающие белки, которые способны вызывать разрывы ДНК, репрессию генов, изменение экспрессии и остановку жизненного цикла клеток хозяина.

Кроме того, по мнению D.L. Lee et al., трихинеллы взаимодействуют с клетками хозяина на ядерном уровне, вырабатывая вещества, которые вовлекаются в контроль транскрипции и трансляции ДНК. Наряду с этим негативное воздействие можно обосновать наличием в секреторно-эксcretорных продуктах личинок *T.*

spiralis двуцепочечной эндонуклеазной активности, которая способствует реорганизации мышечных клеток хозяина и вызывает рост двуцепочечных разрывов ДНК [7].

Цитотоксический эффект, характеризующийся увеличением процента апоптотических клеток в костном мозге беременных самок и их эмбрионов при внутрибрюшинном введении БСЭСР, можно объяснить повышением количества в организме белка теплового шока Hsp 70. Иммуномодуляторная функция Hsp 70 состоит в том, что если в клетке происходят нарушения под воздействием метаболитов паразита, то эта клетка выбрасывает во внеклеточную среду свои белки, которые клетки иммунной системы воспринимают как сигнал опасности [3].

Таким образом, можно сделать выводы, что БСЭСР личинок *T. spiralis* обладает эмбриотоксическим и фетотоксическим эффектами, которые характеризуются повышением в 6,4-10 раз уровней постимплантационной гибели эмбрионов при внутрибрюшинном введении на всех стадиях развития.

Эмбриотоксический эффект на стадии раннего органогенеза сопровождается понижением средней массы эмбрионов в 1,5 раза и уменьшением среднего краниокаудального размера в 1,3 раза. Инъекции белковым секреторно-эксреторно-соматическим продуктом личинок *T. spiralis* на стадии позднего органогенеза приводят к увеличению: средней массы эмбрионов в 2,69 раз и среднего краниокаудального размера в 1,19 раза.

БСЭСР личинок *T. spiralis* обладает генотоксическим эффектом в клетках костного мозга беременных самок крыс и их эмбрионов при введении на стадии раннего и позднего органогенеза, в плодном периоде, которые характеризуются повышением процента ДНК в «хвостах комет», увеличением «длины хвостов комет» и «момента хвоста комет». Изменения этих показателей говорит о росте количества одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК в 2,12-7,5 раз. Рост числа апоптотических клеток в 2,63-10,4 раза характеризует цитотоксический эффект БСЭСР личинок *T. spiralis*.

Литература. 1. Бекиш, В.Я. Состояние генома хозяина при гельминтозах / В.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш // Витебск.– Изд. ВГМУ. – 2004. – С. 40–43. 2. Бекиш, О.-Я.Л. Нарушения в генетическом аппарате соматических и генеративных клеток хозяина, вызванные метаболитами гельминтов / О.-Я.Л. Бекиш, Вл.Я. Бекиш, В.В. Побяржин, В.И. Колмогоров // Вести НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. News of biomedical science. – 2001. – №2. – С. 70-74. 3. Евдонин, А.Л. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции / А.Л. Евдонин, Н.Д. Медведева.- С.-Петербурга, 2009. - т. 51.- № 2: Цитология. – 130-137. 4. Любимов, Б.И. Методические рекомендации по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических веществ / Б.И. Любимов и др. // Ведомости Фармакологического комитета. – М.: – 1998. – №1. – 20 с. 5. Пашинская, Е.С. Применение щелочного гель-электрофореза изолированных клеток в эмбриональных тканях мышей / Е. С. Пашинская, В.В. Зорина, В.Я. Бекиш, В.В. Побяржин // Достижения фундаментальной, клинической, медицины и фармации (Матер. 62-й научной сессии УО «ВГМУ»). – 2007, Витебск. – С. 163–165. 6. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев и др. // 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с. 7. MacLea, K.S. A family history of deoxyribonuclease II: surprises from *Trichinella spiralis* and *Burkholderia pseudomallei* / K.S. MacLea, R.J. Krieser, A. Eastman // Gene. – 2003. – Vol. 13, № 305(1). – P. 1–12. 8. Mak, C.H. Single-stranded endonuclease activity in the excretory-secretory products of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* / C.H. Mak, Y.Y. Chung, R.C. Ko // Parasitology. – 2000. – Vol. 120, Pt. 5. – P. 527–533.

Статья передана в печать 3.01.2011 г.

УДК 619:579.873.21

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM BOVIS* 8 И *MYCOBACTERIUM BOVIS VALLEE*, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛИНА ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА УП «ВИТЕБСКАЯ БИОФАБРИКА»

Притыченко А.Н.

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

Лысенко А.П.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь

Штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee, депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в ПЦР идентифицированы как *Mycobacterium bovis*, имеют типовые антигенные свойства и могут быть использованы для производства туберкулина для млекопитающих на УП «Витебская биофабрика».

M. bovis 8 and *M. bovis* Vallee strains deposited by The Institute of Experimental Veterinary after S. Vyshellessky have identified as *Mycobacterium bovis* by PCR and have typical antigenic properties and can be used for manufacturing the tuberculin for mammals by Vitebsk biological factory.

Введение. Туберкулёз признан проблемой №1 в мире. Туберкулёзом болеют большинство видов животных, а также человек. На протяжении более чем 100 последних лет в области туберкулеза достигнуты огромные успехи, однако учитывая биологические свойства микобактерий туберкулёза, ситуация по данной болезни остаётся по-прежнему сложной. Из числа животных туберкулёз чаще регистрируется среди крупного рогатого скота.

В нашей стране создана система мероприятий по поддержанию благополучия по туберкулёзу животных и в частности крупного рогатого скота [1]. В данной системе мероприятий аллергическая диагностика является ведущей, реализация которой достигается за счёт применения туберкулина очищенного для млекопитающих преимущественно производства УП «Витебская биофабрика».

Для производства туберкулина очищенного для млекопитающих на УП «Витебская биофабрика» используют штамм *Mycobacterium bovis* № 8 и Vallee депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», что соответствует международным требованиям.