

**Бекиш В.Я., докторант кафедры
медицинской биологии и общей генетики**

НАРУШЕНИЯ В ГЕНОМЕ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ДОНОРОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БЕЛКОВЫМИ ПРОДУКТАМИ ГЕЛЬМИНТОВ IN VITRO

Гель-электрофорез единичных клеток (метод "ДНК-комет") считается быстрым и чувствительным флуоресцентно-микроскопическим методом обнаружения первичных повреждений молекулы ДНК отдельных клеток [3]. Метод применяется для оценки генотоксических свойств факторов окружающей среды, а также их цитотоксического воздействия на клетки [3].

Белковые продукты карликовых цепней, власоглавок, аскарид, личинок трихинелл способны повреждать хромосомные наборы лимфоцитов периферической крови доноров при их совместной культивации *in vitro*, вызывая рост аберрантных и анеуплоидных клеток. Исследование влияния белковых соматических продуктов гельминтов на наследственный аппарат лимфоцитов крови доноров *in vitro* позволяет оценить возможные цитогенетические повреждения в соматических клетках хозяина при их непосредственном контакте с паразитарными метаболитами. Однако способность белковых соматических продуктов *Humanolepis nana*, *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* вызывать повреждения молекулы ДНК, апоптоз лимфоцитов периферической крови доноров не изучалась.

Целью исследования было выявить возможные генотоксические и цитотоксические воздействия белковых продуктов *H. nana*, *T. canis*, *T. spiralis* на лимфоциты крови доноров при их совместном культивировании *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследований служила кровь 10 здоровых доноров (5 мужчин и 5 женщин) в возрасте от 25 до 30 лет, а также белковые секреторно-экскреторные соматические продукты (СЭСП) личинок *T. spiralis*, которые готовили по методике О.-Я.Л. Бекиша (1972), и соматические продукты (СП) *H. nana*, *T. canis*, полученные по раз-

работанным нами методикам (1999, 2002). Общую концентрацию белка в них определяли биуретовым методом.

На каждого донора ставилось по 10 флаконов (первый – контрольный, остальные – опытные), каждый из которых содержал 0,5 мл лимфоцитарной суспензии, 2,5 мл среды RPMI-1640 и 350 мкг гентамицина. В опытные флаконы добавляли СП *H. paau*, *T. canis* или СЭСП *T. spiralis* в конечных концентрациях 100, 200 или 400 мкг на 1 мл культурального содержимого. В контрольные пробы вносился стерильный 0,9 % раствор NaCl в том же объеме, что и паразитарные соматические продукты. Культивация осуществлялась в течение 24 часов при температуре 37°C, после чего лимфоцитарную суспензию дважды отмывали в 3 мл среды RPMI-1640 путем 10 минутного центрифугирования при 1100 об/мин и температуре 8°C. После второй отмывки супернатант удаляли, осадок разводили средой RPMI-1640 так, чтобы конечная концентрация клеток составляла $1-5 \times 10^6$ на 1 мл. К 100 мкл клеточной суспензии из контрольного флакона добавляли 200 мкл среды RPMI-1640 и инкубировали 5 мин при температуре 37°C со 100 мкМ H_2O_2 (позитивный контроль). Остальные лимфоциты из контрольных клеточных суспензий использовались в качестве негативного контроля.



Рис. 1. Сканограммы "комет" лимфоцитов крови доноров при проведении щелочной версии гель-электрофореза единичных клеток: клетка в норме (а); клетки с 10-12 % поврежденными участками ДНК в хвосте кометы (б); апоптотическая клетка (в).

Гель-электрофорез единичных клеток проводили в щелочной версии N.P. Singh et al. [7] в модификации В. Neilman et al. [3], которая позволяет определить уровни одноцепочечных отрывов, щелочно-лабильных сайтов молекулы ДНК при воздействии генотоксических факторов. Микропрепараты окрашивали раствором этидия бромидом и анализировали на люминисцентном микроскопе Микмед-2 фирмы ЛОМО при увеличении 600х. Изображения комет на микропрепаратах фотографировали с помощью цифровой фотокамеры Nikon Coolpix-4500. Учет повреждений молекулы ДНК проводили путем

анализа цифровых изображений автоматической программой "CASP v. 1.2.2". С микропрепарата подсчитывалось по 100 клеток, в каждой из которых учитывали длину хвоста кометы в пикселях, а также процент ДНК в хвосте (Рис. 1 а, б). В качестве основного международно-принятого показателя генотоксического воздействия факторов среды использовали момент хвоста, вычисленный из длины хвоста, умноженной на процент ДНК в хвосте. Для оценки цитотоксического воздействия белковых паразитарных продуктов на лимфоциты доноров в 100 случайно выбранных клетках определяли процент апоптотических (Рис. 1 в).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что СП *H. papae*, *T. canis* и СЭСП *T. spiralis* при их добавлении в культуры лимфоцитов крови доноров обладают генотоксическим воздействием, вызывая увеличение количества одноцепочечных отрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК клеток *in vitro*, мигрирующих при гель-электрофорезе единичных клеток в щелочной версии. Рост повреждений ядерной молекулы ДНК клеток зависел от дозы белковых соматических продуктов гельминтов и кратно достоверно возрастал при ее увеличении. Дозозависимый эффект четко прослеживался на изменениях момента хвоста. Рост момента хвоста в 2,6 раза СП *H. papae* был установлен только при увеличении дозы с 200 до 400 мкг/мл. При росте дозы СП *T. canis* и СЭСП *T. spiralis* со 100 до 200 и до 400 мкг/мл наблюдалось кратное достоверное увеличение момента хвоста в среднем в 1,66 - 2,44 раза. Полученные нами результаты согласуются с данными S.C. Chow et al [2], которые в 2000 году установили, что совместная культивация Т-лимфоцитов человека линии Jurkat с половозрелыми *Necator americanus*, а также с экскреторно-секреторными белковыми продуктами этого паразита сопровождается повышением уровней фрагментации ДНК клеток. Изменения находились в линейной зависимости от числа паразитов, концентрации белковых продуктов гельминтов и возрастали при их увеличении [2]. Известно, что в лимфоцитах периферической крови больных нейроцистицеркозом повышаются уровни генных мутаций в локусе *hprt* [5].

Совместно с генотоксическим эффектом белковые соматические продукты гельминтов проявляли и цитотоксическое воздействие, которое характеризовалось ростом апоптотических клеток в культурах лимфоцитов доноров при их добавлении в культуральную среду *in vitro*. Это влияние имело видоспецифический характер и зависело от вида белкового паразитарного продукта, добавленного в культуры лимфоцитов крови доноров. Рост апоптотических клеток в 5,5 раз был отмечен при добавлении СП *H. papae* только в дозе 400 мкг/мл, тогда как этот показатель был выше контрольного уровня при дозах

СП *T. canis* и СЭСП *T. spiralis* в 200 и 400 мкг/мл культуральной суспензии. Кроме того, СП *T. canis* не проявлял дозозависимого цитотоксического воздействия, так как при всех исследуемых дозах паразитарного продукта рост апоптотических клеток был одинаков и в среднем в 3,7 раза был выше по сравнению с негативным контролем. Напротив, при увеличении дозы СЭСП *T. spiralis* до 400 мкг/мл число апоптотических клеток кратно достоверно возрастало в 1,7 раза по сравнению с данными дозы 200 мкг/мл. Полученные нами результаты подтверждаются исследованиями, проведенными при остром и хроническом кишечном шистосомозе мышей, а также у больных асимптоматическим шистосомозом Мэнсона [4, 1]. У инвазированных шистосомами организмов наблюдалось повышение апоптоза Т-лимфоцитов в селезеночных и гранулематозных клетках. Культивация Т-лимфоцитов человека линии Jurkat с цистицерками *Taenia crassiceps*, а также с половозрелыми *Necator americanus* и их экскреторно-секреторными белковыми продуктами сопровождалась повышением числа апоптотических клеток, рост которых зависит от числа паразитов, концентрации белковых продуктов гельминтов и кратно достоверно усиливается при их увеличении [6, 2].

Выводы

1. Белковые СП *H. nana*, *T. canis* и СЭСП *T. spiralis* обладают генотоксическим воздействием на лимфоциты крови доноров, вызывая рост одноцепочечных отрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной молекулы ДНК *in vitro*. Этот эффект зависит от дозы белковых СП, СЭСП и в 1,66-2,66 раза достоверно возрастает при ее двукратном увеличении.
2. Совместно с генотоксическим эффектом белковые СП *H. nana*, *T. canis* и СЭСП *T. spiralis* обладают цитотоксическим воздействием, вызывая рост процента апоптотических клеток при их совместном культивировании *in vitro*. Этот эффект зависит от вида гельминта и проявляется при добавлении СП *H. nana* в дозе 400 мкг/мл, СП *T. canis* – 100, 200, 400 мкг/мл и СЭСП *T. spiralis* – 200, 400 мкг/мл культуральной суспензии.
3. Цитотоксическое воздействие токсикарозного белкового СП одинаково как при малых, так и при высоких концентрациях, тогда как СЭСП *T. spiralis* вызывает рост числа апоптотических клеток в 1,7 раза при двукратном увеличении его концентрации.

Список литературы

1. Carneiro-Santos P. e. a. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni // Parasite Immunology. –2000. –Vol. 22. –P. 267-277.
2. Chow S. C., Brown A., Pritchard D. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes // Parasite

Immunology. –2000. –Vol. 22. –P. 29-37.

3. Hellman B., Vaghef H., Friis L., Edling C. Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers // *Int Arch Occup Environ Health*. –1997. –Vol. 69. –P.185-192.

4. Lundy S. K., Lerman S.P., Boros D L. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL⁺ T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection // *Infection and Immunity*. –Vol. 69, № 1. –2001. –P. 271-280.

5. Montero R., Flisser A., Mandarso I., Cuevas C., Ostrosky P. Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel // *Mutation Research*. –1994. –Vol. 305. –P. 181-188.

6. O'Connell K.M., Rogan M.T. Apoptosis in human Jurkat T cells after culture with live *Taenia crassiceps* cysticerci in vitro // *Parasitology*. –2000. –Jun. –Vol. 120. –P. 649-655.

7. Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. A Simple Technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells // *Exp. Cell Research*. –1988. –Vol. 175. –P.184-191.

Дорошенко А.С., кафедра нормальной физиологии

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА НА КОРОНАРНЫЕ СОСУДЫ ПРИ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОМ СТРЕССЕ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

Психоэмоциональный стресс - неизбежный спутник научно-технического прогресса. В течении дня человек многократно подвергается воздействию стресса различной длительности и интенсивности. В адекватном ответе организма на стрессорное воздействие большое значение принадлежит сердечно-сосудистой системе, и особенно местным факторам регуляции сосудистого тонуса [1]. При достаточно длительном стрессе происходит нарушение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, являющиеся причиной самых различных заболеваний. В связи с этим профилактика стрессорных нарушений имеет особое значение.

Цель исследования: - изучить особенности влияния предварительного введения антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина на показатели ауторегуляции коронарных сосудов и сократительную активность