

УДК 599.323.4:57.017.642:595.132.6

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ТКАНЯХ ЭМБРИОНОВ САМОК КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТРИХИНЕЛЛЕЗЕ

Е.С. ПАШИНСКАЯ

аспирант

Витебский государственный медицинский университет,
Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе д. 27,
e-mail: paschinskaya.cat@yandex.ru

Трихинеллезная инвазия сопровождается окислительным стрессом в клетках эмбрионов самок крыс, который характеризуется повышением уровня диеновых конъюгатов на 63,12 % и малонового диальдегида на 71,32 %, а также снижением активности каталазы на 46,62 %, супероксиддисмутазы на 36,47 %. В тканях эмбрионов беременных крыс, зараженных личинками трихинелл, установлено снижение содержания витаминов и концентрации микроэлементов. Терапия крыс при экспериментальном трихинеллезе одним антигельминтиком (альбендазол, мебендазол) не приводит к нормализации уровней витаминов и минералов в тканях эмбрионов. Применение для комплексной терапии трихинеллеза беременных крыс витаминного комплекса с селеном нейтрализует дисбаланс витаминов и минералов в эмбриональных тканях и негативное действие активнотоксицирующего кислорода.

Ключевые слова: *Trichinella spiralis*, эмбрионы, окислительный стресс, витамины, микроэлементы, комбинированная терапия.

Паразитами, которые постоянно или временно используют организмы других видов как среду обитания или источник питания, являются все живые возбудители болезней человека, животных и растений. В патологии человека паразитарные болезни, и среди них гельминтозы – занимают значительное место. Наиболее широко распространены гельминтозы-антропонозы, однако по тяжести течения и причиняемому ущербу здоровью человека на первый план выходят гельминтозы-зоонозы [4]. Трихинеллез весьма распространенная болезнь в Беларуси и каждые 5 лет ею болеют около 200 человек [7].

Ранее нами было показано, что личинки *Trichinella spiralis* обладают генотоксическим, цитотоксическим и эмбриотоксическим эффектами на клетки костного мозга самок мышевидных грызунов и их эмбрионов как при заражении после наступления беременности, так и при внутрибрюшинном введении белкового секреторно-эксреторно-соматического продукта паразита на различных сроках беременности самок крыс [5, 12]. Также, при изучении изменений уровней малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК), активностей каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в бедренных мышцах и семенниках у мышей-самцов линии СВА, зараженных личинками *T. spiralis*, установлено, что трихинеллезная инвазия средней тяжести у животных сопровождается синхронной активацией свободнорадикальных процессов в мышцах и семенниках [2]. Они характеризуются повышением уров-

ней продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), ДК и МДА, снижением активности ферментов антиоксидантов – СОД и каталазы [10]. Кроме того, известно, что одним из множества негативных воздействий гельминтов является формирование гиповитаминозов. Дефицит витаминов, обладающих антиоксидантными свойствами, обеспечивающих устойчивость организма к инфекциям, способствует снижению иммунитета. В патогенезе заболевания имеет значение нарушение стабильности биологических мембран. Основным процессом, приводящим к их деструкции, является свободнорадикальное перекисное окисление липидов [8].

Цель исследования – изучить изменения концентраций ПОЛ, активностей ферментов антиоксидантного характера, содержания витаминов и микроэлементов у эмбрионов самок крыс линии Wistar при трихинеллезе, а также при комбинированном его лечении.

Материалы и методы

Исследования проводили на 80 самках и 27 самцах крыс линии Wistar массой 250 г в возрасте 4 мес. Наступление беременности определяли по наличию сперматозоидов в мазке из влагалища и гиперемии наружных половых органов самок. Беременных крыс разделили на 8 групп по 10 животных в каждой для проведения двух серий опытов.

В первой серии опытов для исследования изменений концентраций ПОЛ и активностей ферментов антиоксидантного характера использовали животных 1 и 2-й групп; первая была контрольной, вторая – опытной.

Во второй серии опытов для изучения содержания витаминов и микроэлементов в тканях эмбрионов при терапии экспериментального трихинеллеза использовали самок 3-й группы (контроль), 4-й – чистая инвазия; 5-й группе вводили перорально альбендазол, 6-й – мебендазол, 7 и 8-й – сочетание одного из антигельминтиков с ибупрофеном, фенкаролом и витаминами с Se. Терапию экспериментального трихинеллеза проводили с 16 по 18-й сутки беременности.

Животным всех контрольных групп вводили внутривентрально 0,2 мл 2%-ного крахмального геля, а опытных заражали инвазионной культурой личинок *T. spiralis* с первого дня беременности. Получение культуры инвазионных личинок трихинелл для заражения животных проводили по методу Бекиша и соавт. [3].

Для терапии экспериментального трихинеллеза были использованы следующие лекарственные средства: мебендазол в таблетках по 100 мг; альбендазол в таблетках по 200 мг; ибупрофен в форме 2%-ной суспензии; фенкарол в таблетках по 25 мг; антиоксидантный комплекс «АОК-Se», в каждой таблетке которого содержалось 100 мг витамина С, 30 мг витамина Е, 6 мг β-каротина и 0,03 мг селена. При терапии использовали следующие дозировки препаратов: альбендазол – трехкратно в дозе 15 мг/кг; мебендазол – трехкратно в дозе 75 мг/кг; ибупрофен – трехкратно в дозе 30 мг/кг; фенкарол – трехкратно в дозе 0,5 мг/кг; витамины трехкратно в дозировках β-каротина – 6 мг/кг, токоферола ацетата – 80 мг/кг, аскорбиновой кислоты – 200 мг/кг, Se – 20 мкг/кг. Лекарственные средства разводили до нужной концентрации в 2%-ном крахмальном геле и вводили животным внутривентрально при помощи туберкулинового шприца.

На 19-е сутки беременности самок всех групп убивали путем декапитации. Из маток выделяли эмбрионы. Накопление диеновых конъюгатов определяли по методу Гаврилова и соавт. [6], малонового диальдегида – по методу Андреевой и соавт. [1], активность каталазы – по методу Королук и соавт. [11], СОД – по методу Beauchamp et al. [15].

Для изучения содержания витаминов А, Е, В₁, С и провитамина каротина в тканях эмбрионов применяли методику выполнения измерений массовой доли свободных форм водорастворимых витаминов в пробах премиксов, ви-

таминных добавок, концентратов и смесей методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105» и рекомендации по оценке обеспеченности организма сельскохозяйственных животных минеральными веществами [14], определение микроэлементов, марганца, кобальта, железа, селена в тканях эмбрионов самок крыс – с использованием рекомендаций по оценке обеспеченности организма сельскохозяйственных животных минеральными веществами [13].

Результаты обрабатывали статистически с использованием программы Excel 2002. Рассчитывали среднюю арифметическую и ее стандартное отклонение ($M \pm SD$). Достоверность выявленных различий определяли по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В эмбрионах контрольной группы первой серии опытов уровень ДК составил $133,98 \pm 19,26$ нМ/г, концентрация МДА – $198,56 \pm 36,68$ нМ/г, активности каталазы была $1,18 \pm 0,20$ мкМ/л и СОД – $126,47 \pm 34,87$ Ед/г.

В тканях эмбрионов от зараженных личинками трихинелл беременных животных к 19-м суткам инвазии уровень ДК был выше на 63,12 %, концентрация МДА превысила контрольный показатель на 71,32 %, активность каталазы снизилась на 46,62 % и СОД – на 36,47 % по отношению к интактному контролю ($P < 0,05$).

Во второй серии опытов определение витаминов и микроэлементов в тканях эмбрионов показало, что в контрольной группе содержание витамина А составило $0,58 \pm 0,15$ мкг/мл, витамина Е – $3,25 \pm 0,80$ мкг/мл, каротина – $0,39 \pm 0,05$ мкмоль/л, витамина В₁ – $5,94 \pm 0,70$, витамина С – $26,74 \pm 0,78$, марганца – $335,14 \pm 14,93$ мг/кг, железа – $11,01 \pm 0,5$ мг/кг, кобальта – $3,07 \pm 0,35$ мг/кг, селена – $0,30 \pm 0,18$ мг/кг (табл. 1, 2).

В группе зараженных и не леченых животных концентрация витамина А в тканях эмбрионов была в 9,66 раза меньше контрольного уровня (табл. 1). Уровень витамина Е в 1,63 раза был ниже контрольного показателя. Концентрации каротина и витамина В₁ были в 9,75 и 1,29 раза соответственно меньше показателей контроля. Витамина С в эмбрионах зараженных животных в 1,79 раза было меньше, чем у интактных самок крыс. Содержание марганца в тканях эмбрионов было в 1,37 раза меньше контроля, железа – в 1,52 раза, кобальта – в 1,43 ниже контрольных показателей, селена – в 3,33 раза (табл. 2).

При анализе результатов группы, получавшей альбендазол, выяснено, что все показатели содержания витаминов и микроэлементов в тканях эмбрионов достоверно снизились как по отношению к данным интактного контроля, так и к «чистой инвазии». Так, содержание витамина А уменьшилось в 58 раз, витамина Е – в 3,15, каротина – в 19,5, В₁ – в 1,91, витамина С – в 2,25 раза. В то же время содержание марганца снизилось в 1,69 раза, железа – в 1,86, кобальта – в 1,66, селена – в 10 раз в соответствии с интактным контролем.

Сравнение с «чистой инвазией» показало, что концентрация витамина А снизилась в 6 раз, витамина Е – в 1,49, каротина – в 2, В₁ – в 1,46, витамина С – в 1,25 раза. Также отмечено уменьшение содержание марганца в 1,17 раза, железа – в 1,22, кобальта – в 1,16, селена – в 3 раза по отношению к «чистой инвазии».

Пероральное введение беременным крысам мебендазола показало сходные результаты с предыдущей группой. Содержание витамина А в тканях эмбрионов от инвазированных леченых самок достоверно снизилось по отношению к данным интактного контроля в 29 раз, витамина Е – в 3,18, каротина – в 19,5, В₁ – в 2,23, витамина С – в 2,25 раза. В свою очередь, концентрация марганца уменьшилась в 1,71 раза, железа – в 1,83, кобальта – в 1,61, селена – в 30 раз.

При сравнении с данными группы инвазированных, но не леченых животных, выяснено, что уровень витамина А в тканях эмбрионов снизился в 3 раза, витамина Е – в 1,89, каротина – в 2, В₁ – в 1,71, витамина С – в 1,25 раза. Марганец в эмбриональных тканях уменьшился в 1,23 раза, железо – в 1,20, кобальт – в 1,11, селен – в 9 раз.

1. Показатели содержания витаминов в тканях эмбрионов крыс при терапии трихинеллеза антигельминтиками и витаминами (доза заражения 15 лич./г массы тела, с 1-х суток беременности)

Группа	Содержание витамина				
	А, мкг/мл	Е, мкг/мл	каротина, мкмоль/л	В ₁	С
Интактный контроль	0,58±0,15	3,25±0,80	0,39±0,05	5,94±0,70	26,74±0,78
Чистая инвазия	0,06±0,04*	1,99±0,33*	0,04±0,02*	4,54±0,07*	14,90±0,13*
Инвазия + альбендазол	0,01±0,01* [@]	1,03±0,03* [@]	0,02±0,01* [@]	3,10±0,14* [@]	11,84±0,32* [@]
Инвазия + мебендазол	0,02±0,02* [@]	1,05±0,04* [@]	0,02±0,01* [@]	2,66±0,34* [@]	11,88±0,47* [@]
Инвазия + альбендазол + ибупрофен + фенкарол + Vit с Se	0,64±0,21 [@]	3,56±0,82 [@]	0,42±0,05 [@]	5,97±0,52 [@]	26,52±0,82 [@]
Инвазия + мебендазол + ибупрофен + фенкарол + Vit с Se	0,68±0,15 [@]	3,44±1,00 [@]	0,44±0,05 [@]	6,16±0,36 [@]	26,15±1,17 [@]

Примечание. * – достоверное отличие от данных интактного контроля, [@] – от данных чистой инвазии при P < 0,05.

2. Показатели содержания микроэлементов в тканях эмбрионов крыс при терапии трихинеллеза антигельминтиками и витаминами (доза заражения 15 лич./г массы тела, с 1-х суток беременности)

Группа	Содержание, мг/кг			
	марганец	железо	кобальт	селен
Интактный контроль	335,14±14,93	11,01±0,51	3,07±0,35	0,30±0,18
Чистая инвазия	243,7±14,98*	7,22±0,33*	2,14±0,11*	0,09±0,03*
Инвазия + альбендазол	206,93±2,25* [@]	5,91±0,48* [@]	1,84±0,29* [@]	0,03±0,02* [@]
Инвазия + мебендазол	196,56±6,31* [@]	6,00±0,96* [@]	1,91±0,22* [@]	0,01±0,01* [@]
Инвазия + альбендазол + ибупрофен + фенкарол + Vit с Se	349,06±19,47 [@]	10,81±0,53 [@]	3,27±0,51 [@]	0,28±0,03 [@]
Инвазия + мебендазол + ибупрофен + фенкарол + Vit с Se	346,15±32,25 [@]	10,86±0,52 [@]	3,12±0,37 [@]	0,28±0,05 [@]

Примечание. * – достоверное отличие от данных интактного контроля, [@] – от данных чистой инвазии при P < 0,05.

При терапии самок крыс при экспериментальном трихинеллезе одним из антигельминтиков в сочетании с ибупрофеном, фенкаролом и комплексом витаминов с селеном установлено, что содержание витаминов и микроэлементов в тканях эмбрионов не отличается от данных интактного контроля. Достоверные отличия выявлены только при сравнении с группой «чистая инвазия».

Таким образом, можно заключить, что трихинеллезная инвазия сопровождается окислительным стрессом в клетках эмбрионов самок крыс, который характеризуется повышением уровня ДК на 63,12 % и МДА на 71,32 %, а также снижением активности каталазы на 46,62 %, СОД на 36,47 % в соответствии с контролем.

Полученные результаты подтверждаются данными других ученых. Известно, что окислительный стресс индуцирует патофизиологические процессы, а также повреждения ДНК. Генетические процессы являются центральным звеном между обратимыми метаболитическими процессами и процессами, приводящими к гибели клетки. Анализируя данные научной литературы, можно сделать вывод, что основной причиной генотоксичного эффекта гипероксии является формирование кислород-зависимых свободных радикалов. Все известные АФК способны взаимодействовать непосредственно с ДНК. Показано, что усиление спонтанного мутационного процесса сопровождается избыточным образованием АФК и продуктов ПОЛ [8]. К усилению мутационного процесса могут приводить метаболиты гельминтов, выделяемые ими во время всего жизненного цикла. АФК, взаимодействуя непосредственно с ДНК, вызывают повреждения дезоксирибозофосфатных и ДНК-белковых связей, образование апуриновых и апириимидиновых сайтов, окисляют пуриновые и пиримидиновые основания, модифицируют их, что в дальнейшем может приводить к одиночным и парным разрывам ДНК. Таким образом, увеличение уровня АФК могут вызывать первичные повреждения ДНК, лежащие в основе образования генных и хромосомных мутаций [8], что доказано нами в предыдущих исследованиях [5, 12].

Результаты второй серии опыта показали, что при терапии экспериментального трихинеллеза беременных самок крыс альбендазолом или мебендазолом в тканях эмбрионов наблюдается снижение уровня витаминов и микроэлементов А, Е, С, В₁, каротина, марганца, железа, кобальта, селена как по отношению к интактному контролю, так и к «чистой инвазии». Только сочетанная терапия одним из антигельминтиков с ибупрофеном, фенкаролом и комплексом витаминов с селеном восстанавливает баланс всех вышеперечисленных витаминов и микроэлементов в эмбриональных тканях и принимает участие в нейтрализации негативного воздействия АФК. Это можно объяснить антиоксидантными свойствами комплекса витаминов с селеном, который применялся нами для терапии экспериментального трихинеллеза. Значительная роль в защитном эффекте от АФК принадлежит «классическим» витаминам – α-токоферолу, аскорбиновой кислоте, β-каротину. Показана их способность снижать уровень окислительных повреждений при различных патологических состояниях человека [9]. Установленная антиоксидантная активность β-каротина и других каротиноидов позволяет объяснить их роль в торможении процессов ПОЛ. β-каротин обладает иммуномоделирующим и антиоксидантным действием, повышает уровень Т-лимфоцитов в крови, нормализует показатели ПОЛ, снижает уровень эндогенной интоксикации [16].

Как известно, аскорбиновая кислота, витамин Е, селен превосходят другие антиоксиданты плазмы в защите липидов от перекисного окисления.

Комбинированное действие витаминных препаратов носит синергический, аддитивный, антагонистический характер взаимодействия. Синергизм проявляется при использовании витаминов А и Е; оптимум действия витамина Е необходим для протекторного эффекта витамина А. Более того, витамин Е взаимодействует с соединениями селена и играет роль природного иммунорегулятора, стимулирует продукцию антител, нормализует состояние клеточного и гуморального иммунитета [8, 17].

Таким образом, при заражении инвазионной культурой личинок трихинелл беременных самок крыс в тканях их эмбрионов наблюдается снижение содержания витаминов: А – в 9,66 раза, Е – в 1,63, В₁ – в 1,29, провитамина каротина – в 9,75 раза по сравнению с контрольной группой. Концентрация марганца уменьшилась в 1,37 раза, железа – в 7,22, кобальта – в 1,43, селена – в 3,33 раза.

Терапия экспериментального трихинеллеза одним из антигельминтиков (альбендазол, мебендазол) не привела к нормализации уровней витаминов и минералов в тканях эмбрионов. Отмечено снижение концентрации витамина А в 58–29 раз, витамина Е – в 1,49–3,18, В₁ – 1,46–2,23, провитамина каротина – в 19,5 раза по отношению к результатам контрольной группы. Содержание марганца в эмбриональных тканях достоверно уменьшилось в 1,69–1,71 раза, железа – в 1,86–1,83, кобальта – в 1,66–1,61, селена – в 10–30 раз соответственно контрольным показателям.

Применение для комплексной терапии экспериментального трихинеллеза беременных самок крыс витаминного комплекса с селеном нейтрализует дисбаланс витаминов и минералов в эмбриональных тканях и нейтрализует негативное действие АФК. Это подтверждается повышением содержания исследуемых витаминов и минералов в тканях эмбрионов самок крыс до контрольного уровня.

Литература

1. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. – 1998. – № 11. – С. 41–43.
2. Бекиш В.Я., Бекиш О.–Я.Л. Состояние генома хозяина при гельминтозах. – Витебск: Изд. ВГМУ, 2004. – С. 40–43.
3. Бекиш О.–Я.Л., Бурак И.И., Острейко Н.Н. Экспериментальный трихинеллез: методы воспроизведения модели. – Деп. во ВНИИМИ 20.9.82, № Д-5592. – 20 с.
4. Бодня Е.И. Роль паразитарных инвазий в развитии патологии органов пищеварения // Сучасна гастроентерологія. – 2006. – № 3 (29). – С. 56–62.
5. Пашинская Е.С. и др. Воздействие трихинеллезной инвазии на геном хозяина при беременности // Вестн. ВГМУ. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 144–152.
6. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропильных экстрактов // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60–64.
7. Веденьков А.Л. и др. Гельминтозы, протозоозы, трансмиссивные зоонозные и заразные кожные заболевания в Республике Беларусь : информ.-аналит. бюл. за 2008 год // Респ. центр гигиены, эпидемиол. и обществ. здоровья» МЗ РБ. – Минск, 2009. – 33 с.
8. Гуськов Е.П. и др. Генетика окислительного стресса. – Ростов-на-Дону: Изд-во СКНЦ ВЦ ЮФУ, 2009. – 156 с.
9. Губегриц А.Я., Линецкий Ю.В. Лечебное питание. – К.: Выща шк. Головное изд., 1989. – 398 с.
10. Захарова И.Н., Свиницкая В.И. Применение витаминов-антиоксидантов в педиатрической практике // Лечащий врач. – 2010. – № 8. – С. 45–47.
11. Королюк М.А. и др. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
12. Пашинская Е.С. и др. Влияние белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта личинок трихинелл на соматические клетки самок крыс и их эмбрионы на стадиях раннего органогенеза при сенсibilизации // Матер. докл. науч. конф. Всерос. о-ва гельминтол. РАН «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – М., 2010. – Вып. 11. – С. 353–356.

13. Коваленок Ю.К. и др. Рекомендации по оценке обеспеченности организма сельскохозяйственных животных минеральными веществами: Утв. ГУВ МСХиП РБ 10.12.2007 г. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 44 с.
14. Система капиллярного электрофореза. Основы метода. Аппаратура. Примеры использования систем капиллярного электрофореза «Капель-103, -104, -105». – СПб: Петрополис, 2001. – 65 с.
15. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide dismutase: improved assays and an assays applicable acrilamide gels // *Analyt Biochem.* – 1971. – V. 44, № 1. – P. 276–287.
16. Keen C.L. et al. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome // *Am. J. of Clin. Nutr.* – 1998. – P. 1003–1011.
17. Palmieri Ch., Szarek J. Effect of maternal selenium supplementation on pregnancy in humans and livestock // *J. Elementol.* – 2011. – V. 16, № 1. – P. 143–146.

Oxidative stress and change of contents of microcells in embryos tissues at experimental trichinellosis

K.S. Pashinskaya

Trichinellosis is accompanied by oxidative stress in cages of embryos of females of rats which is characterized by increase of level of diene conjugates on 63,12 % and malondialdehyde on 71,32 % and as decrease in activity of catalase on 46,62 %, superoxide dismutase on 36,47 %. In tissues of their embryos has shown decrease in the maintenance of vitamins and reduction of concentration of microelements. Therapy of experimental trichinellosis by one anthelmintic (albendazole or mebendazole) does not lead to normalisation of levels of vitamins and minerals in tissues of embryos. Application for complex therapy experimental trichinellosis of pregnant females of rats of a complex of vitamins of antioxidatic character with selenium will neutralize a disbalance of vitamins and minerals in tissues of embryos and negative action reactive oxygen species.

Keywords: *Trichinella spiralis*, embryos, oxidative stress, vitamins, microcells, complex therapy.