

УДК 576.312.36

РОЛЬ АССОЦИАЦИИ МАРИТ OPISTHORCHIS FELINEUS С ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА—БАРР В ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЯХ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ

© Е. Н. Ильинских, В. В. Новицкий, И. Н. Ильинских, Н. Н. Ильинских

Проведен иммунофлюоресцентный анализ антигенов вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) в теле мари-описторхисов. Установлено, что антигены ВЭБ локализованы в яйцах мари-гельминтов. Введение антигенов описторхисов в культуры лимфоцитов здоровых доноров вызывает появление цитогенетических нарушений, однако структурные aberrации хромосом способны были индуцировать только антигены, полученные из яиц. Аналогичные изменения в культурах вызывало и заражение культур клеток ВЭБ. Обсуждается роль локализации ВЭБ в яйцах мари-описторхисов в распространении этого вируса, а также в генетической и онкопатологии.

Установлено, что описторхозная инвазия сопровождается значительным увеличением числа клеток с цитогенетическими нарушениями (Ильинских и др., 1984). Поскольку описторхис не может непосредственно воздействовать на генетический аппарат клеток организма, возникает обоснованное предположение, что цитогенетические поражения, наблюдаемые при описторхозной инвазии, обусловлены опосредованными механизмами. Наши исследования (Ильинских и др., 1998) позволили установить, что различные части тела мари-описторхисов обладают неодинаковой способностью индуцировать цитогенетические нарушения в условиях культуры клеток человека. Было высказано предположение, что мутагенной активностью обладает ассоциированный с гельминтом инфекционный агент. Поскольку фильтрация дериватов из тела мари-описторхисов не снижала способности индуцировать мутации, то закономерно возникло предположение, что в маридах присутствует вирусный агент. Известно, что способностью индуцировать цитогенетические нарушения обладают вирусы (Nichols и др., 1963; Ильинских и др., 1984). Имеются литературные данные, согласно которым описторхис может находиться в ассоциации с вирусом простого герпеса (Иванских, Ближнюк, 1996). В связи с этим обращают на себя внимание результаты исследований, представленные Ильиным (1992), свидетельствующие о том, что у жителей населенных пунктов, расположенных в бассейнах рек Обь, Иртыш и Томь, где пораженность описторхозом местного населения достигает 86.5 % (Гинецинская, Добровольский, 1978), наблюдается усиление циркуляции потенциально онкогенного вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ), также относящегося к семейству герпесвирусов. При этом эпидемиологические исследования, предпринятые нами в Обь-Томь-Иртышском речном бассейне, показали (Ильинских и др., 1999), что высокий уровень цитогенетически измененных клеток особенно часто отмечается в тех населенных пунктах, где имеется повышенная инвазированность описторхозом и усиление персистенции ВЭБ. В связи с этим возникает закономерное предположение, что ВЭБ может играть существенную роль в цитогенетических последствиях описторхозной инвазии. Результаты исследований в этом направлении, по-видимому, могут позволить внести некоторые коррективы в существующие представления о патогенезе описторхоза.

Цель настоящей работы — изучить возможность ассоциации вируса ЭБ с маридами описторхисов и роль вируса ЭБ в индукции цитогенетических нарушений, наблюдаемых при описторхозной инвазии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Цитогенетический анализ хромосом человека проводили в культурах Т-лимфоцитов периферической крови, стимулированных к делению фитогемагглютинином по стандартной методике (Прокофьева-Бельговская, 1969). Культуры получали от 6 здоровых людей, серонегативных к вирусу Эпштейна—Барр. Половину приготовленных для культивирования образцов предварительно заражали вирусом Эпштейна—Барр путем введения в культуру Т-лимфоцитов суспензионной вируспродуцирующей линии P₃HR-1 в количестве 25 тыс. клеток на 1 мл культуры. Вирус был получен в лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН. Через 24 ч после начала культивирования в питательную среду вводили антигены марит описторхисов, извлеченных из печени трупов людей, умерших от острого нарушения мозгового кровообращения.

В эксперименте использовались два антигена, полученные из марит описторхисов: соматический и яичный (Котелкин и др., 1997). Неповрежденных гельминтов трехкратно промывали в растворе Хэнкса, содержащем фунгизон (2 мкг/мл), пенициллин и стрептомицин (200 мкг/мл). Паразитов помещали в среду ДЕМЕМ(М), производства НПО «Вектор», и культивировали в течение 2 нед. при 37°. Культуральную среду центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин с целью получения осадка, содержащего яйца *Opisthorchis felinus*. Яичный антиген получали путем трехкратной гомогенизации замороженного осадка, затем суспензию 3 раза обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин при 4° в 5 мМ Трис-НСI буфере, рН 7.0. Соматический антиген получали из гомогената гельминтов (прошедших стадию культивирования и не содержащих яиц, замороженных в жидком азоте в 5 мМ Трис-НСI буфере, рН 7.0), трижды обработанного ультразвуком при 4° в течение 1 мин. Все препараты антигенов хранили при -40° в обезвоженном состоянии. В антигенах определяли содержание белка по методу Lowry e. a. (1951) (0.5 мг/мл) и вносили в зараженные и не зараженные вирусом Эпштейна—Барр культуры лейкоцитов по 0.1 мл антигена на 2 мл культуральной среды (2.5 × 10⁻⁸ кг белка/мл). Через 72 ч после начала культивирования проводилось цитогенетическое изучение клеток культуры.

В каждом варианте опытной культуры и в контроле изучено стандартным рутинным методом (Прокофьева-Бельговская, 1969) не менее 100 метафаз, при этом регистрировали как структурные аберрации, так и изменения в числе хромосом.

Проведено иммунофлюоресцентное выявление антигена ВЭБ в лимфоидных и эпителиальных клетках людей, инвазированных *Opisthorchis felinus*, а также в теле марит описторхисов, выделенных из желчных протоков человека. Во всех случаях использован стандартный метод, изложенный Иванниковой и др. (1987) в модификации Иванских и Близняк (1996).

Изучена жизнеспособность и вылупляемость мирацидиев из яиц *O. felinus*, выделенных при дуоденальных зондированиях больных описторхозом методом, описанным Беэр и др. (1991).

При статистической обработке результатов использованы критерии Стьюдента и метод ранговой корреляции Спирмена (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные свидетельствуют (табл. 1), что при введении в культуры Т-лимфоцитов соматических антигенов описторхиса увеличения числа клеток со структурными нарушениями хромосом не происходило (в опыте — 1.2 ± 0.5 при 0.9 ± 0.3 % в контроле; P > 0.05). При этом отмечено увеличение числа клеток с гипоплоидным и гиперплоидным кариотипом (соответственно 2.9 ± 0.4 и 0.7 ± 0.2 при 1.4 ± 0.3 и 0.1 ± 0.1 % в контроле, в обоих случаях P < 0.01). В то же время антигены, полученные из яиц марит *O. felinus*, обладали способностью к повышению числа клеток со структурными нарушениями хромосом. При этом возрастает число клеток с разрывами и обменов хромосом (в обоих случаях P < 0.01). Кроме того, зарегистрировано увели-

Таблица 1

Нарушения в структуре и числе хромосом в культурах Т-лимфоцитов здоровых доноров, зараженных вирусом ЭБ на фоне введения антигенов из марит описторхисов

Table 1. Structural and chromosome number aberrations in T-lymphocyte healthy donor culturals infected with Epstein—Barr virus and *Opisthorchis felineus* antigens

Регистрируемый показатель	Не зараженные ВЭБ культуры лимфоцитов			Зараженные ВЭБ культуры лимфоцитов		
	интактные (контроль)	после введения соматического антигена	после введения антигена из яиц	без введения антигена	с введением соматического антигена	с введением антигена из яиц
Клетки со структурными аберрациями	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.5	7.9 ± 0.5*	8 ± 0.4*	8.5 ± 1.9*	28.1 ± 5.6*
с хроматидными	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.3	3.9 ± 0.5*	4.5 ± 0.2*	4.8 ± 0.6**	16.8 ± 2.1*
с хромосомными	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1*	1.3 ± 0.1*	1.7 ± 0.3*	2.6 ± 0.8*
с обменами	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.9 ± 0.3*	2.2 ± 0.1*	2.2 ± 0.4*	8.4 ± 1.7*
Клетки с измененным числом хромосом	1.6 ± 0.5	2.5 ± 0.5	3.6 ± 0.7*	5.8 ± 0.5*	6.7 ± 0.9*	15.1 ± 3.4*
с гипопloidией	1.4 ± 0.3	2.9 ± 0.4*	1.6 ± 0.4	2.5 ± 0.4	2.8 ± 0.7**	7.3 ± 1.1*
с гиперпloidией	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2*	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.3*	3.7 ± 0.5**
с полипloidией	0.2 ± 0.1	2.3 ± 0.4*	2.3 ± 0.4*	2.3 ± 0.2*	2.7 ± 0.3*	4.2 ± 0.9*
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями	2.4 ± 0.4	3.5 ± 0.7	12.5 ± 0.6*	13.2 ± 1.6*	12.8 ± 2.4**	41.5 ± 5.3*

Примечание. Достоверные отличия от интактного контроля отмечены звездочками: *P < 0.01; **P < 0.05.

чение числа полипloidных клеток (2.3 ± 0.4 при 0.2 ± 0.1 % в контроле; $P < 0.01$). Установлено, что введение в культуру ВЭБ (без введения антигенов *O. felineus*) индуцировало в культуре существенное увеличение числа клеток со структурными нарушениями хромосом (8 ± 0.4 при 0.9 ± 0.3 % в контроле; $P < 0.01$), без возрастания числа клеток с анеупloidией ($P > 0.05$), но с увеличением числа клеток с полипloidным хромосомным набором ($P < 0.01$). Заражение культуры лимфоцитов ВЭБ на фоне введения соматических антигенов *O. felineus* не изменяет настоящей картины в отношении числа клеток со структурными нарушениями хромосом и клеток с полипloidным кариотипом, однако наряду с этим отмечено достоверное повышение числа клеток с гипопloidным и гиперпloidным кариотипом (в обоих случаях $P < 0.01$). Установлено, что особенно существенные поражения в структуре и числе Т-лимфоцитов крови отмечается при заражении культуры ВЭБ на фоне введения антигенов яиц марит описторхисов. Так, общее число цитогенетически измененных клеток достигает 41.5 ± 5.3 % при 2.4 ± 0.4 % в интактном контроле ($P < 0.01$). Среди структурных нарушений особенно часто наблюдались клетки с хроматидными аберрациями и обменами хромосом, одновременно регистрировались клетки с гипо-, гиперпloidным и полипloidным хромосомными наборами. Отмечено появление клеток с пульверизацией всех хромосом лимфоцита.

Гомогенаты тел марит описторхисов были изучены на предмет содержания в них капсидного антигена вируса Эпштейна—Барр с использованием непрямой реакции иммунофлюоресценции. Описторхисы были получены при дуоденальном зондировании больных описторхозом. Анализ интенсивности свечения, выраженный в баллах, свидетельствует о присутствии антигена ВЭБ в большинстве выделенных яиц описторхисов (табл. 2).

При этом было установлено, что жизнеспособность яиц находится в достоверной обратной зависимости от интенсивности свечения антигена в яйцах паразита.

Таблица 2

Число яиц с антигенами ВЭБ и их жизнеспособность в дуоденальном содержимом у больных хроническим описторхозом

Table 2. The number of eggs with Epstein—Barr viral antigens and their survival in the bile of chronic opisthorchiasis patients

Номер больного	Число яиц (в %) с различной степенью иммунофлюоресценции в непрямой РИФ, выраженной в баллах						Число нежизнеспособных яиц (в %)
	0	1	2	3	4	Индекс	
1	2	1	5	10	82	0.8	41.6
2	5	3	20	8	64	0.6	29.3
3	4	4	9	11	72	0.7	36.3
4	6	1	30	29	34	0.4	19.5
5	4	5	10	12	69	0.7	32.1
6	7	7	10	4	72	0.7	31.5
7	3	4	1	1	91	0.9	48.6
8	5	6	30	25	34	0.3	16.3
9	2	2	41	29	26	0.3	15.2
10	6	6	10	12	66	0.7	35.4

Интактные яйца описторхисов помещали в специальную среду, способствующую вылуплению мирацидиев и далее проводили иммунофлюоресцентный анализ на присутствие в яйцах и мирацидиях антигенов ВЭБ. Анализ иммунофлюоресценции свидетельствует, что антигены ВЭБ находятся не на поверхности яйцевых оболочек яйца, а присутствуют в теле мирацидия. Кроме того, было установлено, что, чем выше интенсивность свечения мирацидия, тем менее выражены движения личинки, при этом уже через 10—20 мин после вылупления движение прекращалось. Мирацидии, лишенные антигена ВЭБ, во всех случаях интенсивно передвигались в течение 30—45 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что вирус ЭБ способен вызывать структурные aberrации хромосом в условиях культуры лимфоцитов человека. Практически аналогичные данные зарегистрированы и в случае введения в культуры «яичного» антигена. Соматический антиген таким действием не обладал. Мы склонны рассматривать эти данные в пользу вывода о способности ВЭБ, присутствующего в «яичном» антигене, индуцировать структурные aberrации хромосом в культурах клеток человека. Имеются косвенные доказательства тому, что антигены ВЭБ могут присутствовать в яйцах описторхисов. Так, установлено, что среди ранних вирусных полипептидов имеются следующие классы: 135, 78, 50, 47, 44, 36, 35, 33, 32 и 18 кД (Hummel, Kieff, 1979; Дьяченко, 1984). В то же время анализ антигенов *O. felineus* показывает, что полипептиды классов 50, 44, 33 и 32 присутствуют и в яйцах описторхиса (Котелкин и др., 1998). Полипептиды 50 и 33 кД вообще характерны и для других трематод: *Clonorchis sinensis* (Kim, 1994) и *Paragonimus westermani* (Joo e. a., 1989). Известна способность некоторых вирусов использовать полипептиды клетки хозяина в процессе репликации, кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что ВЭБ способен захватывать генетический материал клеток хозяина и продуцировать белки, не характерные для ВЭБ (Жданов, 1990).

Интересно отметить, что введение вируса герпеса золотистым хомякам, инвазированным описторхисами, вызывает у паразитов резкое снижение продукции яиц и сперматозоидов с индукцией симпластов в генеративных органах паразита (Иванских, Близняк, 1996). Согласно данным настоящей работы, наличие антигена вируса ЭБ, также относящегося к группе вирусов герпеса, способствует уменьшению жизнеспособности

способности яиц и снижает двигательную активность мирацидиев при их вылуплении из яйца.

Полученные данные по локализации антигена ВЭБ в яйцах описторхисов, по-видимому, можно интерпретировать с точки зрения целесообразности этой ассоциации для жизнедеятельности обоих паразитов. С одной стороны, вирус, попадая в тело описторхиса, становится относительно неуязвимым к противовирусному иммунитету организма хозяина. Если ВЭБ способен к трансфазовой передаче, т. е. сохраняться в личиночных стадиях развития описторхиса (мирацидиях, спороцистах, редиях, церкариях и метацеркариях), то не исключается возможность попадания этого вируса вместе с метацеркариями описторхисов в организм человека. Заражение человека описторхисами в свою очередь ведет к увеличению числа В-лимфоцитов (Лепехин и др., 1992), в которых, как известно (Дьяченко, 1984), этот вирус способен активно репродуцироваться. С другой стороны, вирусная инфекция индуцирует в иммунокомпетентных клетках хозяина генетические аномалии, и это способствует усугублению иммунодефицитного состояния (Ильинских и др., 1986), что в свою очередь снижает как противогельминтный, так и противовирусный иммунитет (Ильинских и др., 1984). Поскольку вирус Эпштейна—Барр является одним из основных потенциально онкогенных вирусов человека (Дьяченко, 1984), то представляют несомненный интерес исследования, направленные на выяснение роли этого вируса в развитии рака печени и желчных протоков, характерных для описторхозной инвазии человека (Лепехин и др., 1992).

Список литературы

- Беэр С. А., Герман С. М., Дитрих О., Гибода М. Морфофункциональные особенности ультраструктуры внешней оболочки яиц описторхид. Сообщ. 1. Вылупление мирацидиев // Мед. паразитол. 1991. № 2. С. 18—22.
- Гинецинская Т. А., Добровольский А. А. Частная паразитология. М.: Высш. шк., 1978. 292 с.
- Дьяченко А. Г. Структурная организация генома вируса Эпштейна—Барр // Экспер. онкология. 1984. Т. 6, № 4. С. 3—9.
- Жданов В. М. Эволюция вирусов. М.: Медицина, 1990. 374 с.
- Иванникова Т. А., Королев М. Б., Фролова М. П., Чунихин С. П. Иммунофлюоресцентное выявление вирусных антигенов при ферментативной обработке гистологического и цитологического материала // Вопр. вирусол. 1987. № 3. С. 373—377.
- Иванских В. И., Близнюк В. В. Влияние описторхисов на проявление вирусов герпеса второго типа в эксперименте и их возможное участие в механизме возникновения первичного рака печени // Мед. паразитол. 1996. № 2. С. 23—26.
- Ильин С. Ю. Роль вируса Эпштейна—Барр в цитогенетических изменениях клеток крови у людей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1992. 15 с.
- Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Бочаров Е. Ф. Инфекционный мутагенез. Новосибирск: Наука, 1984. 194 с.
- Ильинских Н. Н., Бочаров Е. Ф., Ильинских И. Н. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет. Новосибирск: Наука, 1986. 268 с.
- Котелкин А. Т., Разумов И. А., Локтев В. Б. Полипептидный состав основных антигенов и выявление доминирующих иммуногенных белков *Opisthorchis felinus* // Вест. РАМН. 1998. Вып. 4. С. 29—34.
- Котелкин А. Т., Разумов И. А., Покровский И. В., Локтев В. Б. Сравнительное изучение соматического, экскреторно-секреторного и яичного антигенов *Opisthorchis felinus* // Мед. паразитол. 1997. № 1. С. 12—16.
- Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1980. 294 с.
- Лепехин А. В., Мефодиев В. В., Филатов В. Г. Эпидемиология и лечение описторхоза. Томск: Том. ун-т, 1992. 186 с.
- Прокофьева-Бельговская А. А. Основы цитогенетики человека. М.: Медицина, 1969. 486 с.
- Hummel M., Kieff E. Mapping of polypeptides encoded by the Epstein—Barr virus genome in productive infection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 79, N 1. P. 5608—5702.

- Ilyinskikh E. N., Novitskiy V. V., Urazova L. N., Isayeva T. M., Ilyinskikh I. N., Ilyinskikh N. N. Assessment of the relationship of chronic opisthorchiasis to Epstein—Barr virus infection as well as some cytogenetical and immunological parameters in two comparable Siberian regions // *Environ. Toxicol.* 1999. Vol. 14, N 4. C. 414—424.
- Ilyinskikh E. N., Lepyekhin A. V., Logvinov S. V., Ilyinskikh N. N. Estimation of the mutagenic potential of the trematode *Opisthorchis felinus* in experimentally infected guinea pigs // *Parasitology Research.* 1998. Vol. 84, N 7. P. 570—572.
- Joo K. H., Ahn H., Chung M. S., Rim H. J. Demonstration of specific and cross reactive components of *Paragonimus westermani* crude antigen by EITB // *Kisaengchunghak Chapchi.* 1989. Vol. 27, N 1. P. 9—14.
- Kim S. I. Immune reactions between excretory-secretory antigen and specific antibodies of *Clonorchis sinensis* before after praziquantel treatment in experimentally infected rabbits // *Korean J. Parasitol.* 1994. Vol. 32, N 1. P. 35—42.
- Lowry H. O., Rosenbrough H. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, N 2. P. 265—275.
- Nichols W. W. Relationships of viruses, chromosomes and carcinogenesis // *Hereditas.* 1963. Vol. 50, N 1. P. 53—80.

Томск, 634050

Поступила 9.03.2000

ROLE OF ASSOCIATION OF OPISTHORCHIS FELINEUS AND EPSTEIN—BARR VIRUS
IN CYTOGENETIC EFFECTS OF INFECTION

E. N. Ilyinskikh, V. V. Novitskiy, I. N. Ilyinskikh, N. N. Ilyinskikh

Key words: *Opisthorchis felinus*, Epstein—Barr virus, cytogenetic effect.

SUMMARY

The immunofluorescence analysis of Epstein—Barr virus (EBV) antigens in the body of *Opisthorchis felinus* (OF) helminths was carried out. It was found that EBV antigens located in eggs of helminth. Adding of OF antigens and/or EBV to the lymphocyte human cultures of healthy donors can induce a cytogenetic damage in cells. A role of EBV location in opisthorchis eggs in chromosome damage and cancer development is discussed.