

## Экспериментальная модель описторхоза на хомяках (*Mesocricetus auratus*)

Макимова Г.А.<sup>1</sup>, Жукова Н.А.<sup>2</sup>, Кашина Е.В.<sup>1</sup>, Львова М.Н.<sup>1</sup>, Катохин А.В.<sup>1</sup>, Толстикова Т.Г.<sup>2</sup>, Огородова Л.М.<sup>3</sup>, Каминский И.П.<sup>3</sup>, Сазонов А.Э.<sup>3</sup>, Мордвинов В.А.<sup>1</sup>

## Experimental model of opisthorchiasis in hamsters (*Mesocricetus auratus*)

Maksimova G.A., Zhukova N.A., Kashina Ye.V., Lvova M.N., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Ogorodova L.M., Kaminsky I.P., Sazonov A.E., Mordvinov V.A.

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск

<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Максимова Г.А., Жукова Н.А., Кашина Е.В. и др.

Получена экспериментальная модель описторхоза на хомяках (*Mesocricetus auratus*), молекулярно-генетическим методом исследована ДНК *O. felineus*, проведено гистологическое исследование печени зараженных хомяков. Установлено, что ПЦР-система позволяет обнаружить *O. felineus* и не дает ложноположительных результатов в отношении *C. sinensis*, *O. viverrini*, *Metorchis bills*. Заражение приводит к выраженным изменениям в печени, которые характеризуются специфической гистологической картиной.

**Ключевые слова:** экспериментальная модель описторхоза, ПЦР-диагностика описторхоза, патологические изменения печени.

An experimental model of opisthorchiasis on hamsters (*Mesocricetus auratus*) was obtained, the DNA *O. felineus* was investigated by molecular methods, histological study of the liver of infected hamsters was carried. Found that the PCR system can detect *O. felineus*, and does not give false positive results in terms of *C. sinensis*, *O. viverrini*, *Metorchis bills*. Infection leads to marked changes in the liver, which are characterized by specific histological.

**Key words:** experimental model of opisthorchiasis, opisthorchiasis PCR diagnostic, liver pathology.

УДК 616.995.122.21.08-092.9:599.323.42

### Введение

Описторхоз — это хронический гельминтоз, вызываемый паразитированием в организме хозяина плоских червей из семейства *Opisthorchiidae*. Показано, что более 40 млн человек заражены описторхидами и более 600 млн входят в группу риска по заражению.

В некоторых районах Китая и Западной Сибири зараженность населения достигает 85% [10]. Ареал распространения описторхид включает в себя территории России и стран СНГ, Китая, Таиланда и многих других, расположенных на Евразийском континенте [9].

В человеке заболевания, вызываемые этими паразитами, развиваются в течение длительного времени, вызывая ряд осложнений. Описторхоз прочно ассоциируется с такими заболеваниями, как гнойный холангит, острый панкреатит, желчнокаменная болезнь, абсцесс печени и стриктура желчных протоков. В районах с высокой зараженностью описторхозом, вызванным *O. viverrini*, увеличен показатель возникновения холангиокарциномы [13]. В связи с этим Международное агентство по исследованию рака в 1994 г. причислило *O. viverrini* к канцерогенам первой категории [11].

Важным инструментом изучения гельминтозов является моделирование на экспериментальных животных. Экспериментальные модели используются для изучения эхинококкоза, вызываемого *Echinococcus multilocularis* (Kroeze, Tanner, 1987), филяриоза, вызываемого *Dipetalonema viteae* (Storey и др., 1985) и *Brugia malayi* (Fanning, Kazura, 1984), шистосомоза, вызываемого *Schistosoma mansoni* (Bin Dajem и др., 2008),

ангиостронгилеза, обусловленного *Angiostrongylus costaricensis* (Ishii, Sano, 2004) и ряда других паразитозов. Для создания модели описторхоза, как правило, используются хомяки вида *Mesocricetus auratus*. На таких моделях при инфицировании *O. viverrini* было показано, что паразит индуцирует формирование холангиокарцином [6, 12, 15]. Модель описторхоза, индуцированного *O. felineus*, ранее использовалась для разработки новых противоописторхозных препаратов [1].

Цель работы — создать модель описторхоза для изучения патологических изменений печени и оценки возможности использования методов молекулярно-генетического выявления ДНК паразита.

## Материал и методы

В эксперименте было использовано 30 хомяков вида *Mesocricetus auratus* в возрасте от 6 до 8 нед. У 20 хомяков была получена модель хронического описторхоза на основании рекомендаций фармакологического комитета Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ [2]. Контрольную группу составили 10 животных. Хомяков содержали в стандартных условиях на основном рационе при свободном доступе к воде и пище.

**Получение экспериментальной модели описторхоза, индуцированного *O. felineus*.** Заражение хомяков проводили перорально 50 метацеркариями *O. felineus*, полученными из рыбы Обского бассейна. Метацеркарии описторхов выделяли из рыб карповых пород (преимущественно елец, плотва), оценку зараженности рыбы описторхозом проводили просмотром всей мышечной ткани с помощью микроскопа.

Из зараженной рыбы методом переваривания в искусственном желудочном соке выделяли метацеркарии описторхов. Для этого мышечную ткань рыбы с кожей и подкожной клетчаткой дважды пропускали через мясорубку. Навеску фарша помещали в сосуд с плоским дном и заливали искусственным желудочным

соком, состоящим из 11 мл концентрированной хлороводородной кислоты, 7 г пепсина, 9 г хлорида натрия и 1 л воды очищенной. На 100 г фарша использовали 1 л искусственного желудочного сока. Затем сосуд помещали на 18—20 ч в термостат при температуре 37 °С.

По истечении указанного времени смесь вынимали из термостата, перемешивали и оставляли на 10—15 мин. За указанное время метацеркарии опускались на дно, образуя осадок. Надосадочную жидкость сливали и пептолизат протирали через два слоя марли, смывая физиологическим раствором в высокую мензурку; 10—15 мин отводили на осаждение метацеркарий, убирая лишнюю жидкость, затем вновь добавляли физиологический раствор и смесь оставляли на 10—15 мин. Процесс повторяли 4—6 раз.

Далее осадок помещали на чашку Петри, которую крутили попеременно по и против часовой стрелки таким образом, чтобы в ее центре собирались метацеркарии. Затем под микроскопом их отбирали микропипеткой и в количестве 50 экземпляров в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида вводили внутрижелудочно экспериментальным животным.

**Выявление ДНК *O. felineus* в инфицированных хомяках.** Через 1 мес после заражения осуществляли овоскопию экскрементов с целью обнаружения яиц *O. felineus*. Яйца описторхов были получены методом флотации, из них по стандартной методике [4] была выделена ДНК.

Далее была проведена видоспецифическая детекция ДНК *O. felineus* методом ПЦР в реальном времени. Особенностью данного метода было то, что использовалась уникальная комбинация праймеров и зондов, позволяющая выявлять также ДНК *Opisthorchis viverrini*, *Metorchis bilis* и *Clonorchis sinensis*. Амплификацию проводили с использованием комплекта реагентов для проведения ПЦР-РВ с референсным красителем ROX, кат. номер R-418 («Синтол»).

Ход работы:

1. Готовят в ПЦР-боксе или ламинаре реакционную смесь из расчета 6 реакций по 25 мкл в каждой (2,5 мкл 10X-ПЦР буфера, 2,0 мкл смеси dNTP (по 2,5 ммоль каждого), 1,5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25 ммоль), 1 мкл Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами (5 ед./мкл), 12 мкл деионизованной воды, 1 мкл олигонуклеотида-F (22,5 мкмоль),

1 мкл олигонуклеотида-R (22,5 мкмоль), 1 мкл зондов для ПЦР-РВ (6,25 мкмоль)) (5 мкл зарезервированы для матрицы).

2. Перемешивают смесь, разаликвотируют по пяти пробиркам (пробирки 0,2 мл для ПЦР-РВ) по 20 мкл в каждую.

3. В одну пробирку добавляют 5 мкл деионизованной воды (– Контроль). В четыре пробирки добавляют по 5 мкл по одной ДНК ОДД в пробирку (+ Контроли ОДД).

4. Проводят амплификацию по программе: (50 °С — 2 мин; 94 °С — 5 мин; 40 циклов (94 °С — 15 с; 60 °С — 15 с)).

В течение шага «60 °С — 15 с» снимают показания флуоресценции по четырем каналам РВ-амплификатора, соответствующим флуорофорам, присоединенным к зондам. В реакционную смесь добавлен краситель ROX. Его флуоресценцию необходимо также детектировать по пятому каналу Real-time амплификатора.

**Исследование печени инфицированных хомяков.** Печень для гистологического исследования была получена на 10-й нед эксперимента. Процедуры забора органов согласованы с биоэтической комиссией на основании Директивы Совета Европы 86/609 ЕЭС [6]. Печень помещалась в 10%-й забуференный формалин. После фиксации в течение ночи при температуре 4 °С образцы обрабатывали в градиенте этилового спирта и ксилола, затем помещали в парафиновые блоки. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под микроскопом.

## Результаты и обсуждение

Клинические проявления заболевания у зараженных экспериментальных животных развивались через 30 сут после заражения. У животных наблюдалось облысе-

ние, отмечалась адинамия и агрессивность. В эти же сроки в фекалиях животных стабильно выявлялись яйца *O. felineus*. Здоровые животные не демонстрировали изменения поведения и внешнего вида, в фекалиях яиц гельминтов не выявлялось.

В результате проведения полимеразной цепной реакции было установлено, что сигнал специфического зонда к *O. felineus* был детектирован выше уровня фона, таким образом, в реакции удалось детектировать наличие в смеси ДНК *O. felineus* (рис. 1). Сигнал зондов, соответствующий *O. viverrini*, *M. bilis*, *C. sinensis*, был детектирован не выше уровня фона, таким образом, в реакции, специфической выявляемому *O. felineus*, зонд не сработал на неспецифической ДНК. Сигнал, соответствующий отрицательному контролю (деионизованной воде), был детектирован не выше уровня фона, таким образом, в реакции нет неспецифического взаимодействия между зондами и олигонуклеотидами. Таким образом, был сделан вывод об успешности прохождения амплификации *O. felineus*.

Исследование показало, что положительный сигнал детектировался для всех 20 зараженных хомяков.

**Гистологическое исследование показало, что у животных, зараженных *O. felineus*, на всех этапах просветы желчных протоков резко расширены, выявлено наличие марит *O. felineus* в просвете желчного протока печени, обнаружена метаплазия эпителия желчных протоков по кишечному типу (рис. 2). Перипортально выражена лимфоцитарная инфильтрация. У всех особей на 10-й нед эксперимента отмечалась пролиферация желчных капилляров с признаками тканевого и клеточного атипизма без выраженной митотической активности, которые формируют трубчатые и железистые структуры и окружены фиброзной тканью (рис. 3).**

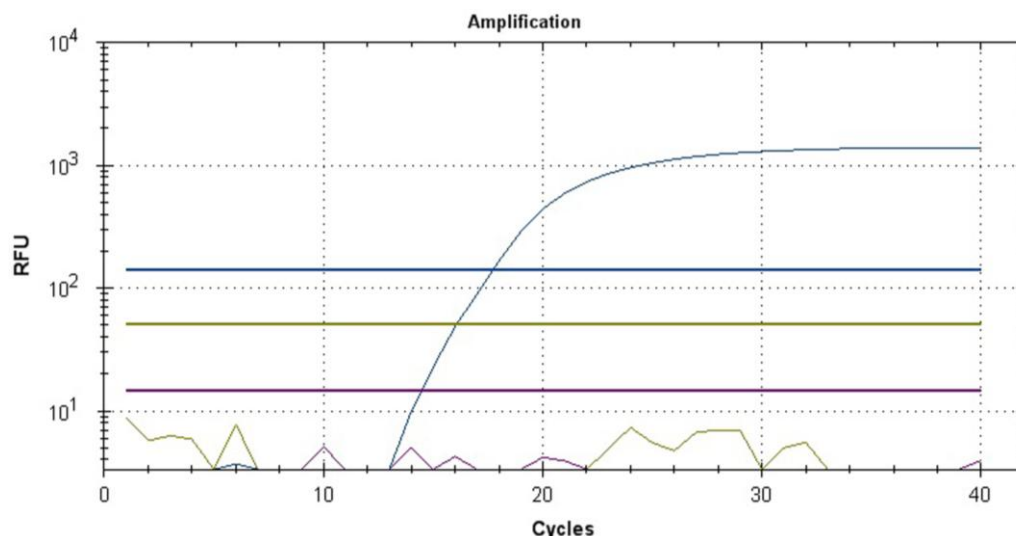


Рис. 1. Проба с ДНК *O. felineus* детектирована с использованием видоспецифичного зонда на амплификаторе CFX 96

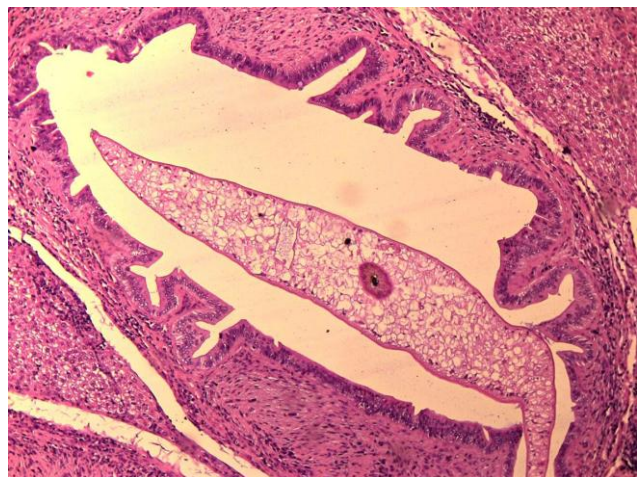


Рис. 2. *Opisthorchis felineus* в просвете желчного протока. Метаплазия эпителия желчных протоков по кишечному типу

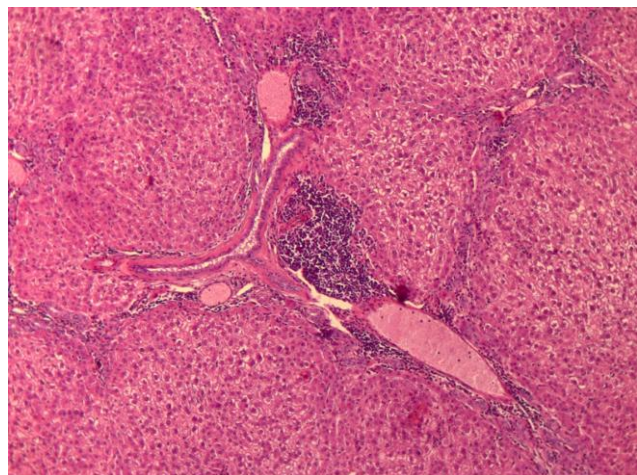


Рис. 3. Периваскулярный лимфоцитарный инфильтрат. Порто-портальный фиброз

В гепатоцитах с 10-й нед выявлялась мелкоочаговая гидропическая и баллонная дистрофия. Также у животных на 10-й нед в просвете желчных капилляров отмечались полипозные разрастания эпителия на ножке, которые полностью или частично обтурировали в просвет крупных желчных протоков.

В печени всех животных, зараженных *O. felineus*, заметно резкое расширение, а также утолщение стенок внепеченочных желчных протоков. Желчный пузырь увеличен, имеет неровные края, утолщенные стенки. Зачастую расширены внутripеченочные протоки и наполнены темной желчью.

В печени животных контрольной группы патологических изменений не выявлено.

### Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало, что молекулярно-генетический подход, основанный на анализе полиморфизма ДНК, позволяет обнаружить *O. felineus* и не дает ложноположительных результатов в отношении *C. sinensis*, *O. viverrini*, *Metorchis bills*. Использование данной ПЦР-системы позволяет работать с любым материалом, содержащим ДНК паразита.

Заражение приводит к выраженным изменениям в печени, которые характеризуются специфической гистологической картиной. Вероятно, такие изменения могут приводить к последующей малигнизации органа.

В целом экспериментальная модель описторхоза на хомьяках (*Mesocricetus auratus*) является адекватной и позволяет исследовать патологические изменения, вызванные *O. felineus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, ГК № 16.522.12.2006.

#### Литература

1. Каминский И.П., Краснов Е.А., Кадырова Т.В. и др. Противоописторхозные свойства экстрактов из *Sentaurea scabiosa* (Asteraceae) // Растительные ресурсы. 2010. № 1. С. 106—112.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд. М., 2005. С. 615—636.
3. Bin Dajem S.M., Mostafa O.M., El-Said F.G. Susceptibility of two strains of mice to the infection with *Schistosoma mansoni*: parasitological and biochemical studies // Parasitol. Res. 2008. V. 103, № 5. P. 1059—1063.
4. Boom R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. 1990. № 3. P. 495—503.
5. Fanning M.M., Kazura J.W. Genetic association of murine susceptibility to *Brugia malayi* microfilaraemia // Parasite. Immunol. 1983. V. 5, № 3. P. 305—316.
6. Flavell D.J., Lucas S.B. Potentiation by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, of the carcinogenic action of N-nitrosodimethylamine upon the biliary epithelium of the hamster // Br. J. Cancer. 1982. V. 46, № 6. P. 985—989.
7. Ishii A.I., Sano M. Strain-dependent differences in susceptibility of mice to experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004. V. 70, № 1. P. 57—62.
8. Kroeze W.K., Tanner C.E. *Echinococcus multilocularis*: Susceptibility and responses to infection in inbred mice // Int. J. Parasitol. 1989. V. 19, №2. P. 199—205.
9. Mordvinov V.A., Furman D.P. The Digenea parasite *Opisthorchis felineus*: a target for the discovery and development of novel drugs // Infect. Disord. Drug. Targets. 2010. V. 10, № 5. P. 385—401.
10. Sayasone S., Odermatt P., Phoumindr N. et al. Epidemiology of *Opisthorchis viverrini* in a rural district of southern Lao PDR // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2007. № 101. P. 40—47.
11. *Schistosomes*, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7—14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994. 61. P. 1—241.
12. Songserm N., Prasongwattana J., Sithithaworn P. et al. Cholangiocarcinoma in experimental hamsters with long-standing *Opisthorchis viverrini* infection // Asian. Pac. J. Cancer. Prev. 2009. V. 10, № 2. P. 299—302.
13. Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P. et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma // PLoS Med. 2007. 4:e201.
14. Storey N., Wakelin D., Behnke J.M. The genetic control of host responses to *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) infections in mice // Parasite. immunology. 1985. V. 7, № 4. P. 349—58.
15. Tesana S., Takahashi Y., Sithithaworn P. et al. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of cholangiocarcinoma in immunized Syrian golden hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and administered with dimethylnitrosamine // Parasitol Int. 2000. V. 49, № 3. P. 239—251.

И.П. Каминский — канд. мед. наук, СибГМУ (г. Томск).

А.Э. Сазонов — д-р мед. наук, СибГМУ (г. Томск).

В.А. Мордвинов — д-р биол. наук, Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

#### Для корреспонденции

Сазонов Алексей Эдуардович, тел. 8 (382-2) 52-99-16; e-mail: sazonov\_al@mail.ru

#### Сведения об авторах

Г.А. Максимова, Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Н.А. Жукова — канд. биол. наук, Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск).

Е.В. Кашина, Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

М.Н. Львова, Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

А.В. Катохин — канд. биол. наук, Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Т.Г. Толстикова — д-р фарм. наук, профессор, Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск).

Л.М. Огородова — д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, СибГМУ (г. Томск).