

К ВОПРОСУ О РОЛИ *TOXOPLASMA GONDII*
В ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Н. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, А. К. Шустров

Кафедра биологии с общей генетикой мединститута, Тюмень

Токсоплазменная инфекция вызывает в костном мозге белых беспородных крыс появление клеток с анеуплоидным хромосомным набором и пульверизацией хромосом. Среди утерянных хромосом отсутствовали определенные хромосомы кариотипа крыс. Увеличенное число анеуплоидных клеток наблюдалось в лейкоцитах периферической крови больных токсоплазмозом и в культуре лейкоцитов нормальных доноров после воздействия токсоплазмином.

Установлено, что некоторые простейшие паразитирующие на двукрылых насекомых способны вызывать в гетерохроматиновых районах полигенных хромосом пробелы и разрывы (Diaz a. Pavan, 1965; Pavan a. Basile, 1966). В доступной литературе нами не обнаружено данных относительно влияния токсоплазм на цитогенетические структуры клеток человека и животных, хотя имеется значительное количество сведений о связи токсоплазменной инфекции у человека с разнообразными заболеваниями хромосомной этиологии. Так, Jirovec и другие (1967) при обследовании на токсоплазм детей с синдромом Дауна и их родителей установили, что около половины всех обследованных имеют положительную реакцию на токсоплазм, на основании чего авторы приходят к выводу, что в этиологии синдрома Дауна большую роль может играть токсоплазменная инфекция. К подобным выводам пришли Балакина (1960), Квиркидзе (1961) и Верулашвили (1963). Аналогичные сведения имеются и о синдроме Шерешевского—Тернера (Крахмальникова и др., 1975) и синдроме Эдвардса (Huttova и др., 1969). Однако имеются исследования, в которых не установлены подобного рода закономерности (Костомарова, Шведская, 1969). Поскольку в большинстве перечисленных работ отсутствует цитогенетический анализ больных и их родителей, то весьма сложно сделать вывод относительно роли токсоплазм в мутагенезе, а следовательно, и в этиологии хромосомных заболеваний.

Настоящая работа предпринята с целью выявления возможных мутагенных свойств *Toxoplasma gondii*, что позволит внести ясность в вопрос о роли токсоплазм в наследственной патологии человека.

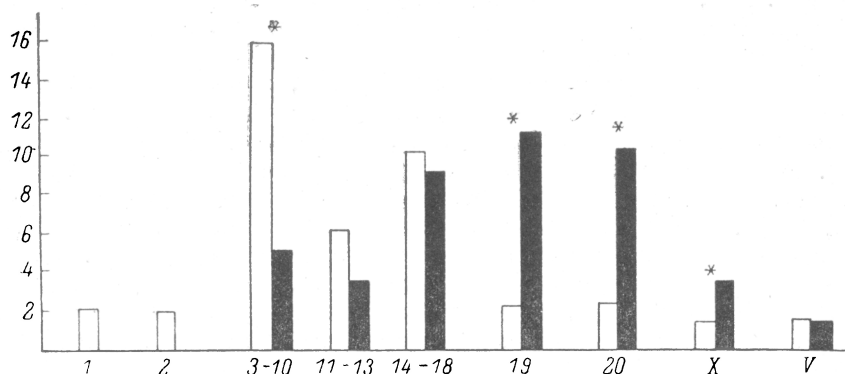
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах, весом 150—160 г. Выбор нами в качестве объекта белых крыс не случаен, поскольку многочисленные наблюдения за больными токсоплазмозом показывают, что эта инвазия у людей протекает хронически. Установлено, что большинство лабораторных животных: белые мыши, хомяки, морские свинки и кролики высокочувствительны к токсоплазме и лишь у белых крыс отмечается латентная форма заболевания (Шеремет, 1964). В исследовании использованы токсоплазмы штамма RH из перитонеального экссудата мышей. Опытным животным было введено внутривентриально 10^6 токсо-

плазм. Контролем служили интактные животные. Забой крыс проводили через 1, 3, 5, 10 и 15 суток после однократного внутрибрюшинного введения токсоплазм. На каждый срок опыта и в контроле использовано по 10 крыс. Приготовление препаратов хромосом из костного мозга осуществляли методом Ford a. Woolam (1963). В каждом случае отбирали по 100 метафаз с учетом предложений Бочкова с соавторами (1966). Идентификацию хромосом проводили по рекомендациям Hungerford a. Novell (1963). Нами проанализирован хромосомный набор лейкоцитов периферической крови 7 больных токсоплазмозом, находившихся на лечении в клинике инфекционных болезней. Забор крови на анализ проводили через неделю после госпитализации больных. Диагностика токсоплазмоза основывалась по клиническим проявлениям болезни и по лабораторным тестам: кожно-аллергической пробе и реакции связывания комплемента. У больных, кроме частоты хромосомных нарушений, изучен уровень бласттрансформации в культуре лимфоцитов крови. Кроме того, изучены мутагенные свойства токсоплазмы, который добавляли в культуру лейкоцитов здоровых доноров в дозах 0.1, 0.2, 0.3 мл на 1 мл культуральной среды. Препараты для изучения хромосом готовили методом Moorhead e. a. (1960). Идентификацию хромосом проводили согласно рекомендациям Денверской комиссии (Robinson, 1960) и Парижской номенклатуре (Paris conference, 1971). Все результаты обрабатывали статистически по Стьюденту и методом χ^2 . Используемые приемы обработки полученных данных не отличались от ранее изложенных (Ильинских, 1975, 1976).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные данные свидетельствуют, что уже через 1 сутки после заражения у крыс наблюдалось появление клеток с пульверизованными хромосомами (табл. 1). Наибольший уровень клеток с пульверизованными хромосомами наблюдался на 5-е сутки после заражения ($7.2 \pm 0.9\%$) при отсутствии таких изменений в контроле. Заражение крыс токсо-



Ожидаемая и наблюдаемая частоты утери хромосом в гипоплоидных клетках костного мозга крыс, зараженных токсоплазмой (в %).

По оси ординат — уровень клеток с измененным числом хромосом (в %); по оси абсцисс — хромосомы и группы хромосом; светлые столбики — ожидаемая частота утери хромосом; черные столбики — наблюдаемая частота утери хромосом; звездочкой обозначено — достоверное отличие ожидаемой и наблюдаемой частот ($P < 0.05-0.01$).

плазмами приводило к увеличению в костном мозге числа клеток с измененным числом хромосом. Так, через 3 суток после заражения $15.8 \pm 0.7\%$ клеток были гипоплоидными при $2.7 \pm 0.3\%$ в контроле ($P < 0.01$) и $2.3 \pm 0.4\%$ — полиплоидными при $0.5 \pm 0.4\%$ в контроле ($P < 0.01$). Еще большие изменения наблюдались через 5 суток соответственно $25.3 \pm 1.4\%$ — гипоплоидных и $3.4 \pm 0.5\%$ — полиплоидных, при этом одновременно увеличивалось число клеток с гиперплоидным набором хромосом — $3.2 \pm 0.4\%$ при $0.6 \pm 0.3\%$ в контроле ($P < 0.01$). Через 10—15 суток частота клеток с измененным числом хромосом несколько снижалась,

Т а б л и ц а 1

Частота нарушений в структуре и числе хромосом в клетках костного мозга крыс, зараженных токсоплазмами (в расчете на 100 клеток)

Время экспозиции	Число клеток		Частота хромосом с нарушениями					Частота клеток с нарушениями в числе хромосом			
	с хромосомными нарушениями	с pulverизацией хромосом	всего	хромосомных разрывов	хроматидных разрывов	обменов	пробелов	всего	гипоплоидных	гиперплоидных	полиплоидных
Контроль (0)	2.7±0.6	—	2.8±0.5	0.5±0.2	1.4±0.2	0.1±0.07	0.8±0.3	3.8±0.9	2.7±0.3	0.6±0.3	0.5±0.4
Через 1 сутки	4.4±0.8**	1.4±0.3	2.9±0.7	0.4±0.2	1.4±0.3	0.3±0.1	0.8±0.4	3.6±0.8	2.1±0.5	0.9±0.4	0.6±0.3
Через 3 суток	8.9±1.0*	5.8±0.8	2.6±0.6	0.3±0.2	1.3±0.4	0.2±0.1	0.8±0.4	19.3±1.1*	15.8±0.7	1.2±0.4	2.3±0.4*
Через 5 суток	9.8±1.2*	7.2±0.9	3.0±0.7	0.7±0.2	1.6±0.6	0.2±0.1	0.7±0.3	31.9±1.8*	25.3±1.4*	3.2±0.4*	3.4±0.5*
Через 10 суток	6.1±0.5*	3.3±0.5	2.8±0.6	0.5±0.2	1.3±0.2	—	1.0±0.4	12.0±0.9*	8.3±0.4*	1.3±0.4	2.4±0.6*
Через 15 суток	2.4±0.4	—	2.8±0.5	0.4±0.2	1.7±0.4	—	0.7±0.3	6.8±0.3*	5.7±0.4*	0.6±0.4	0.5±0.3

П р и м е ч а н и е. Достоверные отличия от контроля отмечены звездочками: одной — при $P < 0.01$, двумя — при $P < 0.05$.

Т а б л и ц а 2

Частота цитогенетических нарушений в лейкоцитах периферической крови у больных токсоплазмозом в сравнении с контролем (в расчете на 100 клеток)

	Число клеток с хромосомными нарушениями	Частота клеток со структурными нарушениями хромосом					Частота клеток с измененным числом хромосом				Всего клеток с цитогенетическими нарушениями	
		всего	хромосомных разрывов	хроматидных разрывов	обменов	пробелов	всего	гипоплоидных	гиперплоидных	полиплоидных		
Контроль	1.9±0.2	2.2±0.2	0.2±0.1	1.2±0.1	0.1±0.08	0.7±0.2	2.8±0.3	2.0±0.2	0.6±0.2	0.3±0.1	4.4±0.3	
Больные	1	3	1	2	—	—	12	9	2	—	13	
	2	1	2	—	1	—	14	11	3	—	14	
	3	12	13	2	7	2	11	11	—	—	19	
	4	18	18	3	10	3	2	19	12	5	2	28
	5	2	3	1	1	—	1	8	8	—	—	9
	6	2	2	—	1	—	1	17	12	3	2	18
	7	1	1	—	—	—	1	14	13	1	—	14
Всего	39	42	7	22	5	8	95	76	14	4	115	
В среднем	5.6±2.5	6.0±2.7	1.0±0.4	3.1±1.5	0.7±0.5	1.1±0.2	13.6±1.3	10.9±0.6	2.0±0.7	0.6±0.4	16.4±2.2	
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05	<0.01	

однако оставалась значительно выше, чем в контроле, за счет повышения числа клеток с гипоплоидным набором хромосом ($5.7 \pm 0.4\%$) при $2.7 \pm 0.3\%$ в контроле, ($P < 0.01$). Уровень гиперплоидных клеток через 10 суток, а полиплоидных через 15 суток после заражения полностью нормализуется ($P > 0.05$). Среди гипоплоидных клеток чаще, чем ожидалось, наблюдались клетки с утерей 19, 20 и X хромосом (см. рисунок). Редко терялись крупные хромосомы генома. Уровень структурных нарушений хромосом у зараженных крыс не отличался от контроля (табл. 1). Под влиянием токсоплазм в клетках костного мозга крыс резко уменьшается число делящихся клеток. Если в контроле митотический индекс составил $17.0 \pm 0.8\%$, то через 1 сутки после заражения — 13.0 ± 0.8 ($P < 0.05$), через 3 суток — 8.3 ± 0.7 ($P < 0.01$), через 5 суток — 3.2 ± 0.9 ($P < 0.01$), через 10 суток — $11.8 \pm 1.1\%$ ($P < 0.01$). Нормализация митотической активности наблюдалась через 15 суток после заражения — $19.0 \pm 1.0\%$ ($P > 0.05$).

Анализ хромосомного набора больных токсоплазмозом (табл. 2) позволил установить, что у всех больных наблюдалось повышенное число клеток с гипоплоидным кариотипом $10.9 \pm 0.6\%$ при $2.0 \pm 0.2\%$ в контроле, ($P < 0.01$). Частота клеток со структурными нарушениями хромосом у большинства больных не отличалась от контроля, однако, как видно из приведенной табл. 2, у двух больных (3 и 4) уровень клеток с хромосомными абберациями был значительно выше, чем в норме (12 и 18% при $1.9 \pm 0.2\%$ в контроле). Токсоплазмоз у этих больных сопровождался эпилептиформными припадками, постоянными сильными головными болями. Реакция связывания комплекта составила 1 : 80 при титрах от 1 : 5 до 1 : 40 у остальных больных. Реакция бласттрансформации на фитогемагглютини, регистрирующая функциональную активность тимусзависимой системы иммунитета, была в 2.5 раза ниже, чем у здоровых доноров, и в 1.3—1.5 раза ниже, чем у остальных больных.

Установлено, что токсоплазм способен вызывать гипоплоидизацию культуры лейкоцитов здоровых доноров. Если в контроле частота гипоплоидных клеток составила $1.8 \pm 0.3\%$, то в опыте через 96 ч инкубации с токсоплазмином (доза 0.3 мл) — 11.3 ± 0.7 ($P < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют, что токсоплазменная инфекция способствует возрастанию числа клеток с измененным набором хромосом. Подобные данные получены при цитогенетическом обследовании больных дизентерией, бруцеллезом, скарлатиной и корью (Ильинских, 1976). Поскольку токсоплазмы не могут непосредственно воздействовать на хромосомный аппарат клеток костного мозга, вполне возможно предположить, что мутагенными свойствами обладают продукты жизнедеятельности токсоплазм. Как установлено, токсоплазм в культуре ткани способен вызывать увеличение числа клеток с анеуплоидным хромосомным набором. Однако в отличие от ранее изученного токсина стрептококка — стрентолизина-0, токсоплазм не вызывает увеличения частоты клеток со структурными абберациями хромосом. По-видимому, токсоплазмы влияют на аппарат деления клеток, что приводит к неверному расхождению хромосом и как следствие к появлению клеток с анеуплоидным кариотипом. Увеличенное число гипоплоидных клеток может быть связано с утратой отставших хромосом (Алов, Казаньев, 1969). Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных токсоплазмозом ослаблена функциональная активность тимусзависимой системы иммунитета, одной из функций которой является элиминация мутантно измененных клеток (Петров, 1976). По-видимому, подавление реакции Т-системы иммунитета может способствовать накоплению клеток, несущих цитогенетические нарушения, в частности структурные абберации хромосом. Установлено, что под воздействием токсоплазм в костном мозге крыс возникают клетки с пульверизацией хромосом. Известно, что многие вирусы, такие как

вирус кори, клещевого энцефалита (Ильинских, 1976), Сендай (Стобецкий, 1975) могут вызывать пульверизацию хромосом. Установлено, что пульверизация возникает в момент синтеза ДНК при слиянии метафазной и интерфазной клеток (Стобецкий, 1975). Способность токсоплазм вызывать пульверизацию свидетельствует о возможном их симпластообразующем действии. Подтверждением служит увеличенное число полиплоидных клеток, некоторая часть которых могла возникнуть за счет слияния соседних клеток и последующего синхронного деления. Таким образом, кроме хорошо изученного тератогенного действия, токсоплазмы способны индуцировать цитогенетические нарушения. Подобного рода изменения в генеративных тканях могут послужить причиной рождения детей с хромосомными аномалиями. В связи с широким распространением токсоплазмоза в человеческой популяции дальнейшее изучение мутагенного действия токсоплазм приобретает несомненный интерес. Накопление знаний поможет разработать меры профилактики вредных последствий влияния токсоплазм на наследственные структуры человека.

Л и т е р а т у р а

- А л о в И. А., К а з а н ь е в В. В. 1969. О судьбе отставших хромосом и микроядер. — ДАН СССР, 187 (1) : 191—192.
- Б о ч к о в Н. П., К о з л о в В. М., С е в а н ь к а е в А. В., А н т о щ и н а М. М. 1966. Анализ анеуплоидии в культурах эмбриональных фибробластов и лейкоцитов человека. — Генетика, 2 (10) : 120—124.
- В е р у л а ш в и л и В. И. 1963. О токсоплазмозе в акушерстве. — Акуш. и гинек., 29 (4) : 451—454.
- И л ь и н с к и х Н. Н. 1973. Хромосомные нарушения в лейкоцитах периферической крови больных скарлатиной. — Цитология и генетика, 7 (4) : 317—320.
- И л ь и н с к и х Н. Н. 1976. Влияние инфекционных факторов на цитогенетические структуры человека и животных. — Цитология, 18 (6) : 731—738.
- И л ь и н с к и х Н. Н., Б о ч а р о в Е. Ф., П ь я т у н и н а Н. В., Ш а с ь л ь Н. С. 1972. Хромосомные нарушения в лейкоцитах периферической крови больных гриппом. — Генетика, 8 (9) : 157—162.
- К в и р к и д з е В. В. 1961. К вопросу о роли врожденного токсоплазмоза в происхождении олигофрении и некоторых других форм психических заболеваний. — Журн. невропат. и псих., 7 : 1059—1062.
- К о с т о м а р о в а М. С., Ш в е д с к а я А. Г. 1969. Роль токсоплазмоза в генезе болезни Дауна. — Тр. Ленингр. науч.-исслед. психоневр. ин-та, 51 : 146—152.
- К р а х м а л ь н и к о в а Г. Х., З а р у б и н а Н. А., Г р а ч е в а Л. И. 1975. Карликовость и синдром Шерешевского—Тернера у больных врожденным токсоплазмозом. — Пробл. эндокринол., 21 (3) : 49—55.
- П е т р о в Р. В. 1976. Иммунология и иммуногенетика. М., «Медицина» : 3—218.
- С т о б е ц к и й В. И. 1975. Индукция конденсации интерфазных хромосом в культивированных лимфоцитах человека. — Цитология, 17 (8) : 976—978.
- Ш е р е м е т О. П. 1964. Серологические исследования при экспериментальном токсоплазмозе белых крыс. — В кн.: Токсоплазмоз, Киев, «Здоровье» : 111—114.
- D i a z M. a. P a v a n C. 1965. Changes in chromosomes induced by microorganism infection. — Proc. Nat. Acad. Sci., 54 : 1321—1332.
- F o r d E. a. W o o l a m D. H. 1963. A study of the mitotic chromosomes of mice of the strang A line. — Exptl. Cell. Res., 32 : 320—325.
- H u n g e r f o r d D. A. a. N o w e l l P. C. 1963. Sex chromosome polymorphism and normal karyotype of three strains of laboratory rat. — J. Morphol., 13 (2) : 272—276.
- H u t t o v a M., R ů s n á k M., L y s á G., I s a k o v i ć V., M i c h ň á č o v á T. 1969. Edwardson syndróm (trisomia 18) u novorodenca. — Ceskosl. pediatri., 24 (9) : 814—820.
- J i r o v e c O., J i r a J., P e t e r R., F u c h s V. 1957. Studien mit dem Toxoplasma. — Zent. f. Bakt. J. Abt. Orig., 169 (1—2) : 129—159.
- M o o r h e a d P. S., N o v e l l P. C., M e l l m a n W. J., B a t t i p s D. M., H u n g e r f o r d D. A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. — Exptl. Cell. Res., 20 : 613—616.
- Paris conference. (1971) : Standardization in Human Cytogenetics. 1972. — Cytogenetics, 11 (5) : 315—362.
- P a v a n C., B a s i l e S. 1966. Chromosome changes induced by infections in tissues of *Rhynchosciara angela*. — Science, 151 (3717) : 1556—1558.
- R o b i n s o n A. A. 1960. A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. — J. Am. Med. Ass., 174 : 159—162.

ON THE PART OF TOXOPLASMA GONDII
IN THE CHROMOSOMAL PATHOLOGY OF MAN AND ANIMALS

N. N. Iljinskikh, I. N. Iljinskikh, A. K. Shustrov

S U M M A R Y

Toxoplasma gondii was found to cause an appearance of cells with a changed number of chromosomes in the bone marrow of infected white rats. Besides the increase of aneuploid and polyploid cells the infection with toxoplasms inhibits the mitotic activity in bone marrow of rats. The similar changes were observed in blood leucocytes of toxoplasmosis patients.
