

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ КОНЕЙ, ІНВАЗОВАНИХ *PARASCARIS EQUORUM*

Винярьська А.В., Стибель В.В.

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.С. Гжицького, м. Львів

Куцан О.Т.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Вперше у 1969 р. ВООЗ розпочала дослідження з метою застосування аналізу хромосомних аберацій для контролю за впливом іонізуючого опромінення та інших факторів навколишнього середовища на організм людини та тварин [7].

За характером змін у генетичному апараті мутації поділяються на геномні, хромосомні, точкові або генні. Для дослідження кожного виду мутацій використовуються тести в системах *in vivo* та *in vitro*. Процеси метаболізму в системі *in vitro* мають більше недоліків: відсутність природного постачання речовин, відмінність у метаболізмі цих систем, неможливість вивчення ролі розподілу речовини та її виведення з організму, мутації в клітинах індикаторних організмів не можуть бути ідентичними з мутаціями у ссавців і т.п. [3].

Хромосомний аналіз *in vivo* є тестом, що характеризує дію різних за походженням мутагенів на цілісний організм. Хромосомні зміни аналізують у метафазах мітотичного поділу клітин проліферуючих тканин [18]. Пошкодження хромосом у експериментальних тварин *in vivo* найчастіше вивчають у лімфоцитах крові, кістковому мозку і соматичних тканинах [14, 15].

Одним з найбільш важливих генетичних аспектів взаємин у системі паразит-хазяїн слід вважати мутагенну дію паразита на спадковий апарат соматичних і генеративних клітин хазяїна, що проявляється на рівні організму, органу, тканин, клітин, а також на молекулярному. Ця дія здійснюється за рахунок секреторно-екскреторних виділень гельмінтів.

Вперше в 1981 р. А.Г. Гіновкер і співавтори [2, 4] показали, що інвазія метацеркаріями *Opisthorhis felineus* викликає в клітинах кісткового мозку золотистих хом'яків підвищення кількості клітин з порушеннями в структурі та числі хромосом. Встановлено збільшення хромосомних розривів, транслокацій, зростання рівнів гіпоплідних, гіперплідних і поліплідних клітин у досліді.

У багатьох роботах науковців [1, 10, 16] було показано, що секреторно-екскреторні виділення гельмінтів мають мутагенно активність. Метаболіти трематод (*O. felineus*, *S. mansoni*), цестод (*H. nana*, *T. solium*) і нематод (*A. suum*, *T. muris*, *T. spiralis*) здатні ушкоджувати хромосомні набори соматичних клітин хазяїв [4, 5, 9, 12, 13, 16].

Міграційний аскароз супроводжується підвищенням рівня аберації хромосом у лімфоцитах периферичної крові поросят з 7-ї по 21-у добу після зараження [10].

У патогенетичному механізмі за експериментального трихурузу реєструються генетичні зміни соматичних клітин з ознаками: гіпоплідія, гіперплідія, аберантні клітини [11].

Метою роботи було дослідження мутагенної дії зажиттєвих виділень личинок *Parascaris equorum*.

**Матеріали і методи досліджень.** Для проведення досліджень сформовано чотири групи тварин по шість клінічно-здорових лошаг віком 4-6 місяців, яких підбирали за принципом аналогів за породою, масою, віком, статтю, розвитком. До зараження та в процесі дослідів групи тварин знаходилися в однакових умовах годівлі та утримання.

Інвазійні яйця параскарисів тваринам вводили з тубів по беззубому краю: лошатам першої групи 800; другої групи – 4000; третьої групи – 8000 інвазійних яєць на тварину.

Інвазійні яйця параскарисів отримували при культивуванні яєць у термостаті за температури плюс 23 °С впродовж 12 діб. Інвазійність яєць параскарисів визначали за рухом личинок всередині яєць при підігріві культури до температури 37 °С за загальноприйнятими у гельмінтології методами [6]. Збір крові проводили до зараження та на 7-у, 14-ту, 21-у, 28-у доби. Препарати метафазних хромосом із лімфоцитів крові готували за загальноприйнятною методикою [17]. Кров культивували *in vitro* у живильному середовищі ІГЛА з глютаміном та сироваткою крові великої рогатої худоби. У якості стимулятора проліферації використовували фітогемаглютинін фірми «Difco» у стандартному розведенні.

Фіксацію клітин проводили на 48-у годину від початку культивування. Препарати метафазних хромосом піддавали рутинному фарбуванню у 2 %-му розчині барвника Гімза протягом 8-10 хвилин. Після цього препарати промивали протягом 1-2 хвилин під слабим струменем води і висушували на повітрі.

Вивчення хромосом проводили за допомогою мікроскопа «Jenamed-2» (CarlZeissJena) із збільшенням, що становить 1000 одиниць. Від кожної тварини аналізували 100 метафазних пластинок. Облік аберацій хромосом проводили згідно рекомендацій ВООЗ [8].

**Результати досліджень.** Після аналізу хромосомного апарату коней, заражених інвазійними яйцями *Parascaris equorum*, виявлено хромосомні аберації, хроматидні аберації та явище поліплідії. Найбільш часто встановлені порушення структури хромосом (ендоредупліканти, дицентрики, центричні кільця). Поліплідні клітини були представлені у вигляді зменшеного або збільшеного каріотипу, переважно, на одну хромосому.

Дослідженнями каріотипу клітин лімфоцитів периферичної крові контрольних коней, за розвитку параскарозу було встановлено, що кількість хроматидних аберацій складала від 0,74±0,08 до 0,99±0,11 %, хромосомних від 0,78±0,08 до 0,96±0,07 %, поліплідних від 1,82±0,15 до 2,00±0,12 % (табл.).

При зараженні параскарозом у першої групи експериментальних тварин на 14-ту добу інвазії відсоток хроматидних аберацій був у 2,6 рази вищим від показника контрольної групи (P<0,001), рівень хромосомних аберантних клітин у 2,1 рази вірогідно був вищим, ніж у контрольній групі тварин (P<0,01), відсоток поліплідних клітин був у 1,4 (P<0,01) рази вищим від показників контрольної групи коней. До 21-ї доби експерименту відсоток хроматидних аберацій був у 2,0 рази вищим, ніж у контролі (P<0,05). Кількість хромосомних аберацій перевищувала у 2,2 рази цю величину у контрольних тварин (P<0,01). На 28-му добу рівень хроматидних аберацій був у 1,7 вище показника контрольної групи (P<0,05).

У другої групи дослідних тварин до 7-ї доби інвазії кількість хромосомних аберацій у 1,9 рази вірогідно перевищувала показники контрольної групи (P<0,05). На 14-ту добу інвазії всі показники значно зросли, за цих умов відсоток хроматидних аберацій був у 3,5 (P<0,001) рази вищим від показників контрольної групи тварин. Рівень хромосомних аберацій у 2,6 рази був вірогідно вищим, ніж у контрольній групі (P<0,001). Кількість поліплідних клітин була у 1,6 раз вища, ніж у контролі (P<0,001). До 21-ї доби експерименту відсоток хроматидних аберацій зріс у 2,1 рази (P<0,001). Кількість хромосомних аберацій перевищувала у 2,3, поліплідних клітин у 1,4 рази ці величини у контрольних тварин (P<0,01).

Таблиця – Частота та спектр аберацій хромосом у коней, інвазованих *Parascaris equorum*, проліферуючих % (M±m, n=6)

Показники	До зараження	Після зараження				
		7 доба	14 доба	21 доба	28 доба	
Конт-роль	Хроматидні аберації	0,92±0,07	0,87±0,09	0,74±0,08	0,99±0,11	0,92±0,13
	Хромосомні аберації	0,94±0,09	0,78±0,08	0,96±0,07	0,87±0,08	0,94±0,17
	Поліплоїдія	1,92±0,08	2,00±0,12	1,86±0,06	1,91±0,13	1,82±0,15
1-група	Хроматидні аберації	0,98±0,05	1,12±0,17	1,96±0,21***	2,02±0,31*	1,52±0,18*
	Хромосомні аберації	0,89±0,11	1,14±0,19	1,98±0,22**	1,92±0,29**	1,24±0,17
	Поліплоїдія	1,84±0,07	2,12±0,11	2,56±0,17**	1,96±0,21	1,84±0,15
2-група	Хроматидні аберації	1,00±0,06	1,33±0,19	2,59±0,25***	2,11±0,12***	1,13±0,23
	Хромосомні аберації	0,97±0,12	1,47±0,21*	2,48±0,29***	2,02±0,31**	1,03±0,32
	Поліплоїдія	1,97±0,23	2,54±0,22	3,04±0,17***	2,69±0,18**	1,92±0,24
3-група	Хроматидні аберації	0,91±0,11	1,49±0,22*	2,78±0,16***	2,08±0,32**	1,08±0,25
	Хромосомні аберації	0,89±0,09	1,63±0,19**	2,81±0,18***	1,79±0,28*	0,99±0,33
	Поліплоїдія	2,01±0,13	2,96±0,23**	3,72±0,22***	2,43±0,31	2,12±0,42

Примітки: \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$

У третьої групи інвазованих тварин частота аберацій хромосом характеризувалася до 7-ї доби досліду вірогідним зростанням кількості хроматидних аберацій у 1,7 ( $P < 0,05$ ), хромосомних аберацій у 2,1 ( $P < 0,01$ ) та поліплоїдних у 1,5 рази ( $P < 0,01$ ). До 14-ї доби експерименту кількість хроматидних аберацій складала 2,78±0,16 %, хромосомних аберацій – 2,81±0,18 %, поліплоїдних клітин – 3,72±0,22 %, рівень вірогідності становив ( $P < 0,001$ ). На 21-шу добу інвазії рівень хроматидних аберацій перевищував контрольні величини у 2,1 ( $P < 0,01$ ), хромосомних аберацій у 2,1 рази ( $P < 0,05$ ). До 28-ї доби інвазії кількість хроматидних, хромосомних аберацій та поліплоїдних клітин дещо знижувалася і становила відповідно 1,08±0,25 %, 0,99±0,33 % та 2,12±0,42 %.

**Висновки.** 1. Цитогенетичний аналіз частоти та спектру аберацій хромосом показав, що прижиттєві виділення нематоди *Parascaris equorum* призводять до підвищення рівня хромосомних аберацій у лімфоцитах крові лоша.

2. Підвищення рівня хромосомних аберацій у лімфоцитах периферичної крові з 7-ої до 21-ої доби інвазії можливо пов'язано із високою біологічною активністю паразитів і виділенням великої кількості прижиттєвих виділень безпосередньо у тканини хазяїна.

3. Зниження кількості хромосомних аберацій у лімфоцитах периферичної крові зареєстровано на 28-му добу зараження, можливо, є наслідком зменшення виділення екскреторно-секреторних виділень личинками, спричинене зниженням їх біологічної активності та елімінацією із кишечника.

#### Список літератури

1. Бекиш, Вл. Я. Мутагенное воздействие мигрирующих личинок аскарид на геном хозяина // Мат. конф. "Вирусные инфекции на пороге XXI века; эпидемиология и профилактика". – СПб, 1999. – С. 276.
2. Гиновкер, А.Г., Ильинских, Н.Н., Шкурко, И.И. Хромосомные нарушения и иммунореактивность золотистых хомячков, инвазированных *Opisthorhis felinus* // Паразитологи. – 1981. – № 1. – С. 62-68.
3. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І.Я. Коцюмбас, О.Г. Малик, І.П. Патерега та ін.; За ред. І.Я. Коцюмбаса. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.
4. Ильинских, Н.Н. Проблема описторхоза на севере Тюменской области в связи с его влиянием на генетические структуры организма // Особенности патологии коренного и пришлого населения в условиях Крайнего Севера. – Красноярск, 1981. – Т. 2. – С. 198.
5. Калинин, Л.В., Бекиш, О.-Я.Л. Оценка мутагенной активности трихинеллезной инвазии с помощью цитогенетических тестов // Актуал. пробл. медицинской и ветеринарной паразитологии (Тез. докл. международной науч. конф.). – Витебск, 1993. – С. 11-12.
6. Котельников, Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды. – М.: Колос, 1984. – С. 60-61.
7. Методы анализа хромосомных аберацій у человека / За ред. К.Бактон, Г.Эванс. Женева, 1975. – 64 с.
8. Руководство по изучению генетических эффектов в популяции человека. Женева. ВОЗ, – 1989, 121 с.
9. Степанов А.В. Влияние трихоцефалезной инвазии на кариотип соматических клеток хозяина // Актуал. вопросы мед. (Тез. докл.). – Витебск, 1994. – 19 с.
10. Стилль, В.В. Экспериментальный аскаридоз: цитогенетичні, імунологічні та біохімічні зміни у поросят і показники мутагенності *Ascaris suum* та авермектинів: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Біла Церква, 1996. – 21с.
11. Стилль, В.В. Цитогенетичні дослідження лімфоцитів крові свиней інвазованих *Trichuris suis* // Ветеринарна медицина. – Харків, 2006. – Вип. 86. – С. 345-349.
12. Bekish, V.I.J., Pobjarzhin, V.V. Helminthes metabolites mutagenes influence on host somatic cells // Abstr. of 2nd Inter. medical conference for students and young doctors. – Lublin (Poland), 2000. – P. 14.
13. Flisser, A., Gonzales, D., Plancarte, A., Ostrosky, P., Montero, R., Stephano, A., Correa, D. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis // Parasitol. Res. – 1990, – Vol. 76. – P. 640-642.
14. Galloway, S.M. Cytotoxicity and Chromosome Aberrations In Vitro: Experience in Industry and the Case for an Upper Limit on Toxicity in the Aberration Assay // Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen. – 2000. – Vol. 35. – P. 191-201.
15. Gomez, J.L., Campos, C., Rangel, P., Ortiz, R. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling // Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen. – 1996. – Vol. 352. – P. 57-60.
16. Hamada, F.M.A., Abdel-Aziz, Badr F., Moustafa A., Rashad A. The mutagenic effect of praziquantel in *S. mansoni* – infected mice. // Arab. J. Lab. - 1992. – Vol. 18. – P. 301-311.
17. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res., – 1960. – Vol. 20. – P. 613-616.
18. Natarajan, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future // Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen. – 2002. – Vol. 504. – P. 3-16.

#### CYTOGENETIC RESEARCHES OF BLOOD LYMPHOCYTES OF INFESTED WITH *PARASCARIS EQUORUM* HORSES

Vynyarska A.V., Stybel V.V.

Lviv National Academy of Veterinary Medicine of the name S.Z. Gzhytskyj, Lviv

Kutsan O.T.

National Scientific Centre „Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv

There has been found that *Parascaris equorum* and their metabolites cause cytogenetic disorders of the frequency chromosome aberration spectrum in blood lymphocytes of infested horses.