

## ВПЛИВ ЗАЖИТТЄВИХ ВИДІЛЕНЬ ЛИЧИНOK *PARASCARIS EQUORUM* НА УТВОРЕННЯ МІКРОЯДЕР В ЕРИТРОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ КОНЕЙ

А. В. Винярска<sup>1</sup>

Львівський національний університет ветеринарної медицини  
та біотехнологій імені С. З. Гжицького

Дослідження периферичної крові коней із використанням мікроядерного тесту, як швидкого скринінгу реєстрації нестабільності геному, дають підстави стверджувати, що зажиттєві виділення личинок *Parascaris equorum* здатні викликати утворення мікроядер в еритроцитах периферичної крові коней. Нами встановлено вірогідне збільшення кількості еритроцитів із мікроядрами, а також збільшення розмірів мікроядер, що можливо пов'язано із високою біологічною активністю паразитів і виділенням великої кількості ксенобіотиків безпосередньо у тканини хазяїна.

**Ключові слова:** ПАРАСКАРИСИ, ПАРАСКАРОЗ, МУТАГЕНЕЗ, МІКРОЯДЕРНИЙ ТЕСТ, ЕРИТРОЦИТИ КРОВІ, КОНІ

Найбільш розповсюдженим паразитом свійських коней віком до двох років в Україні є нематода *Parascaris equorum*. Дорослі тварини є лише носіями цієї інвазії. Параскароз коней спричиняється імагінальною та личинковою формами нематоди. Вивчення системи паразит-хазяїн досі базується на досвіді попередників та глибокому аналізі впливу агентів довкілля. Результати наукових досліджень, опубліковані за останні десять років, свідчать про те, що існує взаємодія між хімічними, фізичними та біологічними факторами, які відіграють важливу роль пускового механізму та виникнення хромосомних аберацій. Мутації у статевих клітинах можуть призводити до спонтанних абортів, мертвороджених, вроджених аномалій розвитку, до збільшення частоти спадкових захворювань. Мутації у соматичних клітинах пов'язанні із процесами канцерогенезу, старіння, порушення ембріонального розвитку тощо. [10]. До недавня увага акцентувалась на фізичних та хімічних чинниках. Сучасні дослідження вказують і про вплив біологічних факторів на виникнення, тобто індукцію мутацій. Зокрема, про це вказують дослідження впливу метаболітів гельмінтів на геном у тесті Еймса [9, 15]. Науково доведено, що мутагенним впливом на генетичний апарат хазяїна володіють метаболіти шистосом, аскарисів, трихінел, трихурисів, гіменолепісів, фасціол та ін. [2, 4, 5, 7, 12–14, 16]. Специфічність пошкодження хромосомного набору обумовлена генотоксинами опісторхісу. Відомо, що гельмінти продукують ферменти, пептидні гормони, білки, кислоти, гормони, токсичні аміни, антигени містять протеолітичні ферменти з антикоагулятивними властивостями, а також ацетилхолінестеразу, амілазу, протеїнази, РНК-азу, ДНК-азу та інші ферменти, які виділяються у просвіт кишечника хазяїна [1, 7–9]. Єдиного методу, за допомогою якого можна було б зареєструвати всі види мутацій, не існує. Методи цитогенетичного аналізу є найбільш чутливими щодо встановлення мутагенного впливу чинників довкілля та дозволяють реєструвати зміни на хромосомному і геномному рівнях організації спадкової інформації [3, 8]. Одним із цитогенетичних методів експрес-оцінки генетичної небезпеки ксенобіотиків *in vivo* у ссавців є мікроядерний тест [10, 21, 22]. Цей метод отримав широке застосування у гуманній та

<sup>1</sup> Наукові консультанти: Стибель В. В., д. вет. н., професор, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького (м. Львів), Куцан О. Т., д. вет. н., професор, член-кореспондент НААН, Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків)

ветеринарній медицині для визначення мутагенної дії чинників довкілля [18, 20] і рекомендований Міжнародним Агентством захисту навколишнього середовища як один із високочутливих методів виявлення мутагенів і канцерогенів [17].

Мікроядра вперше були виявлені в еритроцитах як елементи ядерного, тобто хроматинового походження. Їх класифікують на дрібні, середні та великі. Дрібні мікроядра складаються з ацентричних фрагментів хромосом, що було продемонстровано за допомогою вимірювання вмісту ДНК [19]. Середні та великі мікроядра можуть бути утворені з цілої хромосоми в результаті нерозходження хромосом, що спричинене дефектами веретена розподілу під впливом мутагенної речовини [23]. Застосування мікроядерного тесту дозволяє диференціювати кластогенні (утворення дрібних мікроядер із фрагментів хромосом) і анеугенні (утворення середніх і великих мікроядер із поодиноких хромосом або груп хромосом) дії чинників довкілля [8]. Питання про вплив гельмінтів на показники мікроядерного тесту в інвазованих тварин уперше почали вивчати у 1992 р. Із застосуванням мікроядерного тесту в кістковому мозку експериментальних тварин були встановлені факти мутагенної дії метаболітів цестод (*Taenia solium*, *Hymenolepis nana*) і нематод (*A. suum*, *T. canis*, *T. muris*, *T. spiralis*) на соматичні клітини хазяїна [6]. Власне тому, встановлення можливості індукції мутагенезу зажиттєвими виділеннями гельмінтів становить особливе зацікавлення. Проведення досліджень у цьому напрямі є актуальним та має практичне і теоретичне значення при вивченні геному коней. Ці дослідження є одним з фрагментів дисертаційної роботи. Метою роботи було дослідження мутагенної дії зажиттєвих виділень личинок *Parascaris equorum* на частоту появи поліхроматофільних еритроцитів у кров'яному руслі (периферичній крові коней) для встановлення нестабільності геному з використанням мікроядерного тесту.

#### **Матеріали і методи**

Для проведення досліджень сформували чотири групи тварин по шість клінічно-здорових лоша віком 4–6 місяців, яких підбирали за принципом аналогів за породою, масою, віком, статтю, розвитком. До зараження та в процесі дослідів тварини усіх груп були в однакових умовах годівлі та утримання.

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

Інвазійні яйця параскарисів отримували при культивуванні яєць у термостаті за  $t+23^{\circ}\text{C}$  упродовж 12 діб. Інвазійність яєць параскарисів визначали за рухом личинок всередині яйця при підігріві культури до температури  $37^{\circ}\text{C}$  за загальноприйнятими у гельмінтології методами [11].

Забір крові проводили на 7, 14, 21, 28-у доби. Для визначення змін в еритроцитах кров наносили на предметне скельце, змішуючи її з краплею 10 % розчину натрію цитрату. Приготовлені мазки сушили на повітрі, фіксували в метанолі та зафарбовували барвником Гімза. Під мікроскопом (збільшення 90x10) підраховували кількість мікроядерних поліхроматофільних еритроцитів у 1000 клітинах кожного препарату. Мікроядрами в кров'яних клітинах вважали помітні великі утворення з діаметром  $1/5$ – $1/20$  розміру еритроцита. Результати дослідів виражали у проміле.

#### **Результати й обговорення**

Аналіз препаратів із різних серій дослідів показав, що в еритроцитах периферичної крові коней мікроядра виявлялися з різною частотою у різні доби проведення експерименту.

При зараженні коней параскарисами на сьому добу дослідження встановлено, що частота еритроцитів із мікроядрами у першій дослідній групі становила  $3,4 \pm 1,08$ , що у 5,7 раза більша, ніж у контролі ( $P < 0,05$ ). На 14-ту добу досліджень кількість еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові лоша становила  $5,6 \pm 1,12$ , що у 7 разів більше ніж у тварин контрольної групи ( $P < 0,01$ ). На 21-у добу експерименту

прослідковувалося зменшення кількості еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові лошат першої групи у порівнянні з 7-ою добою, але порівняно з тваринами контрольної групи цей показник був вищим у 2,8 раза ( $P<0,05$ ). При проведенні дослідження периферичної крові лошат на 28-му добу встановлено зниження кількості еритроцитів з мікроядрами до  $1,7\pm0,32\%$ .

Таблиця

**Кількість еритроцитів із мікроядрами у периферичній крові коней уражених *Parascaris equorum*, ‰ (M±m, n=6)**

Показники	До зараження	Після зараження (‰)			
		7 доба	14 доба	21 доба	28 доба
Контроль	$0,8\pm0,33$	$0,6\pm0,17$	$0,8\pm0,12$	$1,1\pm0,42$	$0,9\pm0,18$
1-а група	$1,0\pm0,28$	$3,4\pm1,08^*$	$5,6\pm1,12^{**}$	$3,1\pm0,54^*$	$1,7\pm0,32$
2-а група	$1,1\pm0,22$	$3,9\pm0,84^{**}$	$6,0\pm1,32^{**}$	$4,2\pm0,96^*$	$2,4\pm0,78$
3-я група	$0,70,13$	$4,1\pm1,11^*$	$6,7\pm1,27^{***}$	$3,6\pm0,84^*$	$2,0\pm0,63$

Примітка: \* —  $P<0,05$ ; \*\* —  $P<0,01$ ; \*\*\* —  $P<0,001$ .

При дослідженні периферичної крові тварин другої групи на 7-му добу встановлено, що частота еритроцитів у 6,5 разів більша, ніж у контролі ( $P<0,01$ ), що становило  $3,9\pm0,84\%$  та  $0,6\pm0,17\%$ . На 14-ту добу експерименту кількість еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові лошат становила  $6,0\pm1,32$ , що у 7,5 раза більше порівняно з тваринами контрольної групи ( $P<0,01$ ). До 21-ї доби кількість еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові зменшилась у порівнянні з 14-ою добою, але відносно тварин контрольної групи залишалась високою —  $4,2\pm0,96\%$  — 3,8 раза. На 28-у добу експерименту кількість еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові тварин 2-ої групи становила  $2,4\pm0,78\%$  на 1000 еритроцитів.

До 7-ої доби частота еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові лошат 3-ої групи перевищувала контроль у 6,8 раза ( $P<0,05$ ) і становила  $4,1\pm1,11\%$ . На 14-ту добу кількість еритроцитів з мікроядрами у тварин 3-ої групи була вища у 8,4 раза, ніж у тварин контрольної групи ( $P<0,001$ ) і становила  $6,7\pm1,27\%$ . На 21-у добу інвазії кількість еритроцитів з мікроядрами була у 3,3 раза вища відносно контролю ( $P<0,05$ ). До 28-ї доби експерименту у тварин 3-ої групи встановлено зниження кількості еритроцитів з мікроядрами до  $2,0\pm0,63\%$ .

#### Висновки

1. Зажиттєві виділення личинок *Parascaris equorum* здатні викликати утворення мікроядер в еритроцитах периферичної крові коней.
2. Утворення поліхроматофільних еритроцитів із мікроядрами у периферичній крові коней, уражених *Parascaris equorum* залежить від особливостей біології та життєвого циклу паразита.
3. Мігруючі личинки паскарисів мають мутагенну дію на клітини периферичної крові коней, що проявляється у збільшенні числа мікроядровмістних еритроцитів.
4. Зниження кількості еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові на 21- та 28-у доби експерименту є наслідком зменшення життєвих виділень личинок *Parascaris equorum*.

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчити частоту та спектр аберацій хромосом у лошат, експериментально заражених інвазійними яйцями, у період міграції личинок *Parascaris equorum*.

V. Vynajrska

# INFLUENCE OF VITAL SECRETION OF PARASCARIS EQUORUM LARVAS ON MICROCORES FORMING IN ERYTHROCYTES OF PERIPHERAL HORSES BLOOD

## Summary

The researches of peripheral horse blood with using of microcores test as quick testing of genom instability list prove that vital secretion of *Parascaris equorum* larvas can give rise to forming the microcores in erythrocytes of peripheral blood in horses. Conducted by us researches showed that migrant larvae of ascaris and them metabolites is caused by the mutagenic changes of somatic cages of horses which result in the reliable increase of quantity of red corpuscles with micronucleus, what is possible an owner is related to high biological activity of vermin selection of a plenty of xenobiotics directly in fabrics.

A. B. Винярская

## ВЛИЯНИЕ ПРИЖИЗНЕННЫХ ВЫДЕЛЕНИЙ ЛИЧИНОК *PARASCARIS EQUORUM* НА ОБРАЗОВАНИЕ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛОШАДЕЙ

### Аннотация

Исследование периферической крови лошадей с использованием микроядерного теста, как быстрого скрининга регистрации нестабильности генома, дают основания утверждать, что прижизненные выделения личинок *Parascaris equorum* способствуют образованию микроядер в эритроцитах периферийной крови лошадей. Нами установлено увеличение количества эритроцитов с микроядрами, а также увеличение размеров микроядер, что возможно связано с высокой биологической активностью паразитов и выделением большого количества ксенобиотиков непосредственно в ткани хозяина.

1. Апатенко В. М. Паразитология как парадигма в науке и образовании / Апатенко В. М. // Проблемы зооінженерії та ветеринарної медицини. — Харків, 2006. — Вип. 13 (38), ч. 3. — С. 3–20.
2. Артеменко Ю. Г. Зміни кількості формених елементів крові поросят при нематодозах / Ю. Г. Артеменко, С. І. Пономар, В. П. Гончаренко // Актуальні питання ветеринарної патології : Матеріали І Всеукр. наук.-вироб. конф. вет. патологів, Київ, 13–16 лист. 1996. — К., 1996. — С 32–34.
3. Бактон К. Методы анализа хромосомных aberrаций у человека / К. Бактон, Г. Эванс // ВОЗ. — Женева, 1975. — 64 с.
4. Бекиш В. Я. Генетические аспекты взаимоотношений в системе паразит–хозяин при аскаридозе / В. Я. Бекиш // Ткан. гельминтозы: диагностика, патогенез, клиника, лечение и эпидемиология : Тр. науч.-практич. конф. — Витебск, 2000. — С. 18–27.
5. Бекиш В. Я. Защита наследственного аппарата клеток хозяина при трихинеллезе / В. Я. Бекиш // Вестник ВГМУ. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 77–84.
6. Бекиш В. Я. Мигрирующие личинки аскарид и их метаболиты как мутагены : Сб. науч. тр. IV съезда врачей–инфекционистов РБ / В. Я. Бекиш. — Витебск, 1997. — С. 21–22.
7. Бекиш В. Я. Повреждения ДНК клеток костного мозга и семенников при экспериментальном гименолепидозе / В. Я. Бекиш // Вестник ВГМУ. — 2004. — Том. 3, № 3. — С. 22.
8. Бочков Н. П. Наследственность человека и мутагены внешней среды / Н. П. Бочков, А. Н. Чеботарев // АМН СССР. — М. : Медицина, 1989. — 272 с.
9. Винярская А. В. Исследование мутагенного действия в тесте Еймса : материалы докладов науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» / А. В. Винярская. — Москва, 2011. Вып. № 12. — С. 102–105.

10. Коцюмбас І. Я. 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.
11. Котельников Г. А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды / Г. А. Котельников. — М. : Колос, 1984. — 128 с.
12. Стибель В. В. Вплив інвазії *Oesophagostomum dentatum* на геном білих нелінійних щурів / В. В. Стибель // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. — Львів, 2005. — Т. 7, № 3 (26), ч. 1. — С. 115–122.
13. Стибель В. В. Вплив трихуринової інвазії на частоту виявлення мікроядер в еритроцитах білих нелінійних щурів у мікроядерному тесті / В. В. Стибель // Ветеринарна медицина. — Харків, 2005. — Вип. 85. Т. 2. — С. 1050–1054.
14. Стибель В. В. Изменения в наследственном аппарате свиней при аскаридозной инвазии : Труды IV Междунар. науч.-практ. конф. / В. В. Стибель. — Витебск, 2004. — С. 73–75.
15. Стибель В. В. Изучение гомогената, прижизненных выделений *Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Oesophagostomum dentatum*, их инвазионных яиц и личинок в тесте Еймса : Материалы IV Междунар. науч.-практ. конф. / В. В. Стибель. — Витебск, 2005. — С. 180–181.
16. Стибель В. В. Пошкодження ДНК клітин кісткового мозку за експериментального трихуридозу / В. В. Стибель // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. — Біла Церква. — 2006. — Вип. 39. — С. 122–127.
17. Cimino M. C. New micronucleus guideline for the U.S. environmental protection agency. U.S. EA, office of Toxic Substances, Health and Environmental Review Division, Washington DC / M. C. Cimino // *Mutat. Res. Envir. and Mol. Mutagen.* — 1991. — Vol. 17, Suppl. 19. — P. 83.
18. Fenech M. The Human MicroNucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans / M. Fenech, N. Holland, W. P. Chang et al // *Mutat. Res. Fund, and Mol. Mech. of Mutagen.* — 1999. — Vol. 428. — P. 271–283.
19. Heddle J. A. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by  $\gamma$ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments / J. A. Heddle, A. V. Carrano // *Mutat. Res.* — 1977. — Vol. 44. — P. 63–69.
20. Kirsch-Volders M. Report from the in vitro micronucleus Assay Working Group / M. Kirsch-Volders, T. Sofimi, M. Aardema et al // *Mutat. Res. Envir. and Mol. Mutagen.* — 2000. — Vol. 35. — P. 167–172.
21. Schmid W. The micronucleus test / W. Schmid // *Mutat. Res.* — 1975. — Vol. 31, № 1. — P. 9–16.
22. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis / W. Schmid // *Chemical Mutagens; Principle and Methodes for their detection.* Edited by: A. Hollaende (Plenum, New York). — 1976. — IV, ch. 36. — P. 31–53.
23. Yamamoto K. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons / K. Yamamoto, Y. Kikuchi // *Mutat. Res.* — 1980. — Vol. 71. — P. 127–131.

**Рецензент:** Гуфрій Д. Ф., доктор ветеринарних наук, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.