

УДК 619: 616. 98: 619: 615

Соболта А.Г., к. вет.н., асистент ©  
Львівський національний університет ветеринарної медицини  
та біотехнологій імені С.З.Гжицького

### ВПЛИВ ФАСЦІОЛОЦИДІВ НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ FASCIOLA HEPATICA IN VITRO

Вивчали вплив фасціолоцидів бронтелу 10 %, комбітрему, як ймовірних джерел цитологічних змін у клітинах сперматогенного циклу *Fasciola hepatica*, що важливо враховувати при вивченні механізмів виникнення у фасціол резистентності до фасціолоцидних антигельмінтиків.

**Ключові слова:** *Fasciola hepatica*, сперматогенез, резистентність, фасціолоциди, бронтел 10 %, комбітрем.

**Вступ.** Резистентність фасціоли пов'язана з гаметогенезом та ценогенезом фасціол [6]. Гаметогенез у фасціол – перший етап розвитку, на якому відбувається найбільш висока (для всього онтогенезу) селекція гамет (статевих клітин) через інтенсивну загибель більшості з них на всіх етапах їх розвитку внаслідок порушень в них після ендогенних або екзогенних впливів.

На нашу думку, було доцільно визначити, які цитоструктури більш чутливі до дії фасціолоцидів, які більш стійкі до пошкоджуючої дії, до визначення класу антигельмінтиків тощо; адже цитологічні дослідження дії фасціолоцидів на статеві клітини фасціол до теперішнього часу не проводились. Це може мати певне значення, тому що дозволяє визначити загальну резистентність фасціол до цитотоксичної і мутагенної, допустимої і порогової дози для проявлення нею цитопатичного, мутагенного та інших ефектів і розробити заходи проти лікоопірності.

Нами проведена серія експериментів з метою визначення комплексу критеріїв оцінки і відпрацювання схеми проведення експериментів для виявлення гаметотропної (гаметотоксичної) дії фасціолоцидів.

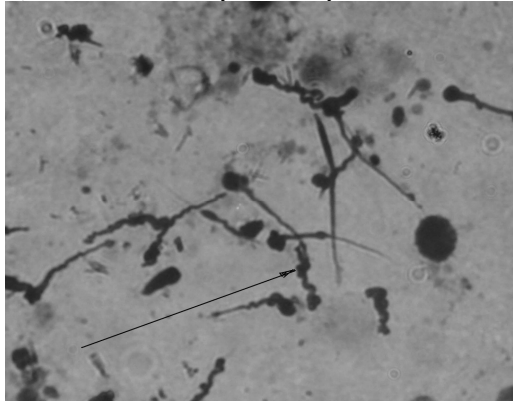
Для цього в експериментах *in vitro* на фасціол діяли фасціолоцидами комбітрем та бронтел 10 %, враховуючи певні етапи сперматогенезу гельмінта.

**Матеріал і методи.** Для вивчення цитотоксичної дії фасціолоцидних препаратів на сперматогенез, статевозрілих паразитів після відбору з жовчних ходів, від забитих на бойні тварин, поміщали у термос, в лабораторії промивали в розчині Хедон-Флейга декілька разів та поміщали по 20 екз. фасціол у стерильні посудини ємністю 500 мл з розчинами різних концентрацій комбітрему та бронтелу 10 % на 24 години. Антигельмінтики вносили у розчин Хедон-Флейга відповідно до терапевтичних доз [10] та наближених рівнів у крові. Комбітрем розводили у концентраціях 0,1; 0,05; 0,025; 0,012; 0,006; 0,003; 0,0015 мг/см<sup>3</sup>; бронтел 10 % відповідно – 1,2; 0,6; 0,3; 0,1; 0,07, 0,03 і 0,017 мг/см<sup>3</sup>. Нерозчинний у воді фасціолоцид – комбітрем розводили етиловим спиртом: до 10-ти мг препарату додавали 0,16 мл етилового спирту [3]. Одна

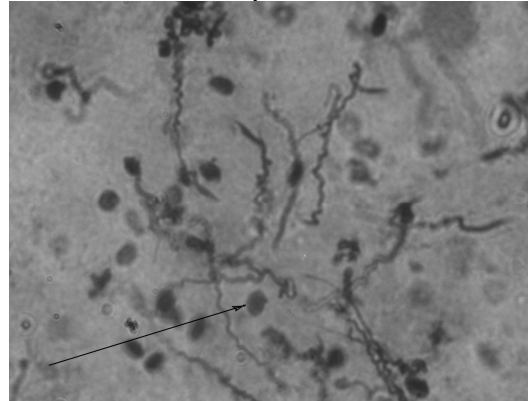
посудина без антигельмінтиків була контролем. Після чого, гіпотонізацію, фіксацію та виготовлення тимчасових тиснених тотальних препаратів проводили згідно методам [1, 5, 6, 9] у деяких модифікаціях (Соболта А.Г., 2004) [8]. Оцінку результатів з вивчення клітин на стадіях сперматогенного циклу *F. hepatica* проводили шляхом виявлення та диференціації первинних, вторинних та третинних сперматогоніїв, сперматоцитів першого та другого порядків, а також сперматид і спермійв [8, 11]. Препарати оцінювали методом порівняння, кожні 6, 12 та 24 год, нормальних та змінених клітин сперматогенного циклу у кожній фасціоли, зміни у яких були викликані дією фасціолоцидів.

Фотографування здійснювали за допомогою цифрової фотокамери "SONY W5" та світлового мікроскопа марки "Jenamed 2" (Carl Zeiss Jena) із цифровим та оптичним збільшенням до 1100 разів.

**Результати досліджень.** З попередніх даних морфологічних досліджень *in vitro* виявлено, що спермій фасціоли складався з цитоплазматичної голівки та джгутика [8]. З наших досліджень, за допомогою світлової мікроскопії, за впливу фасціолоцидних препаратів вдалося виявити деякі відмінності, що полягали в утворенні дегенеративних форм спермійв. Так, комбітром у концентрації  $0,05 \text{ мг/см}^3$  викликав скручення джгутиків спермійв через 12 годин за досліджень *in vitro* (рис. 1), а через 24 години експерименту у концентрації  $0,1 \text{ мг/см}^3$  він сприяв відриванню їх голівок, як це видно з рис. 2.

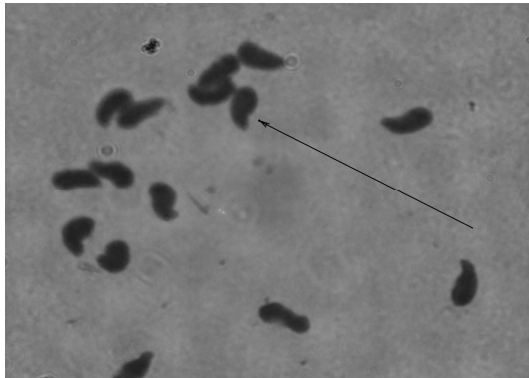


**Рис 1.** Скучення джгутиків спермійв під впливом комбітреду (12 годин), ацетокармін ( $10 \times 100$ ).

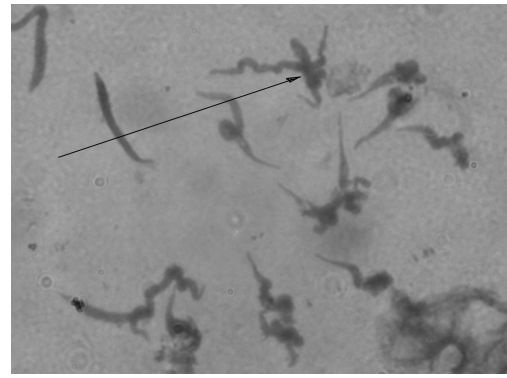


**Рис. 2.** Відриви голівок спермійв під впливом комбітреду (24 години), ацетокармін ( $10 \times 100$ ).

Через 12 годин, під дією бронтелу 10 % у концентрації  $0,6 \text{ мг/см}^3$ , відбувалися зміни у сперміях, а саме затримувалось їх утворення із сперматид, так як у контрольній групі ці зміни не спостерігались, а проходив нормальний розвиток усіх клітин сперматогенного циклу. Щодо впливу препаратів на інші клітини сперматогенного циклу, а саме на сперматоцити (рис. 3), ми виявили досить цікаві відмінності. Під дією бронтелу 10 % у концентрації  $1,2 \text{ мг/см}^3$  вони характеризувались зменшенням кількості сперматоцитів на 12-ту годину експерименту, порівняно з контрольними препаратами та змінами у сперматидах, що проявлялись їх скрученням (рис.4).



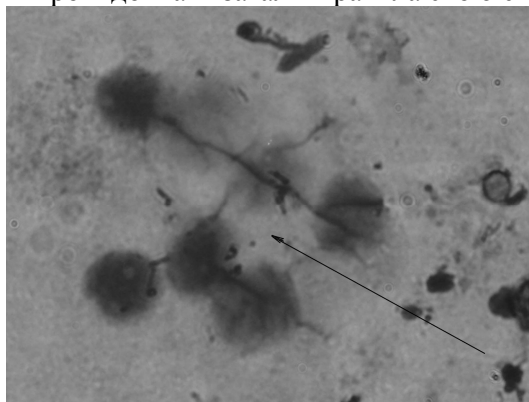
**Рис. 3.** Зменшення кількості сперматоцитів під впливом бронтелу 10 % (12 годин), ацетокармін (10x100).



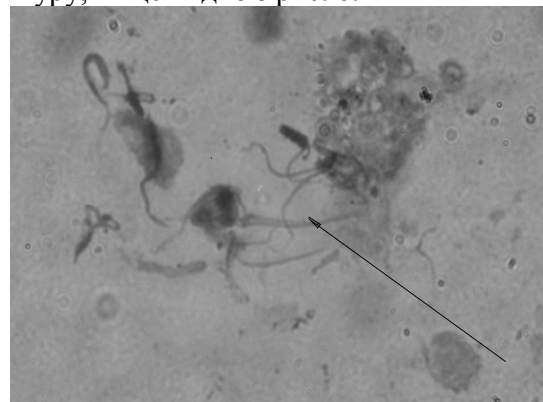
**Рис. 4.** Скручення сперматид під впливом бронтелу 10 % (12 годин), ацетокармін (10x100).

Очевидно, цей антигельмінтик досить швидко проявив свою деструктивну дію, про що свідчило і зменшення кількості клітин сперматоцитів, порівняно із контрольною групою, на 12-ту годину експерименту.

Також спостерігали зміни у сперматидях і за дії комбітрему. Через 12 годин у концентрації антигельмінтика  $0,05 \text{ мг/см}^3$  сперматиди скручувались, відзначалось суттєве зменшення їх кількості на 24-ту годину дослідження у концентрації  $0,025 \text{ мг/см}^3$  та порушення розвитку стадії "трояндочки", яка характеризувалась утворенням восьми первинних сперматоцитів. Уже через 6 годин у концентрації препарату  $0,05 \text{ мг/см}^3$  зміни на стадії "трояндочки" були досить суттєвими (рис. 5), порушилась нормальна структура цього утворення та зникла одна клітина, а через 24 години впливу комбітрему за цієї ж дози, "трояндочка" взагалі втратила свою структуру, як це видно з рис. 6.



**Рис. 5.** Дегенерація "трояндочки" сперматоцитів під впливом комбітрему (6 годин), ацетокармін (10x100)



**Рис. 6.** Дегенерація "трояндочки" сперматоцитів під впливом комбітрему (24 години), ацетокармін (10x100)

Причиною таких руйнувань могла бути фрагментація і автофагія центральної цитоплазми на стадії формування "трояндочки".

З'ясовано, що комбітрем *in vitro* у концентрації 0,05 мг/см<sup>3</sup> викликав параліч фасціоли протягом 2-ох годин, а зміни в сперматогенному циклі через 6 годин. Порівнюючи вплив комбітрему та бронтелу 10 % на сперматогенез фасціоли можна припустити, що *in vitro* перший є більш ефективним вже на ранніх стадіях поділу клітин (див. табл. 1).

Таблиця 1

**Вплив фасціолоцидів на чоловічу статеву систему *F.hepatica in vitro***

Експозиція, год	Антигельмінтики															
	комбітрем, мг/см <sup>3</sup>								бронтел 10 %, мг/см <sup>3</sup>							
	0,0	0,1	0,05	0,025	0,012	0,006	0,003	0,0015	0,0	1,2,	0,6	0,3	0,1	0,07	0,03	0,017
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
24	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: "+" – зміни в репродуктивній системі; "-" – відсутні зміни

Комбітрем належить до групи бензimidазолів, а бензimidазоли, як відомо [2, 3, 4] порушують полімеризацію тубуліну, який відповідає за утворення мікротрубочок (формування цитоскелету клітин), як наслідок, утворюються цитологічно дефектні клітини, які не здатні виконувати покладені на них функції і накопичення такого роду клітин неминуче може призводити до різноманітних патоморфологічних змін.

Також, слід зазначити, що у розведеннях антигельмінтиків у більших концентраціях, було відмічено зменшення загальної кількості клітин сперматогенного циклу і навпаки.

Проблема цитопатології гамет фасціоли, яка виникає під впливом фасціолоцидів, знаходиться на стадії накопичення фактів. Питання про причини та динаміку розвитку патологічних змін у статевих клітинах, ступеня вираження, можливості відновлення або ступеня зворотності порушень, можливості віддалених наслідків, які відбулися на більш ранніх етапах розвитку гамет, практично ще не відображені у спеціальній літературі і, вивчаються.

**Висновки.** Вплив фасціолоцидних препаратів може бути джерелом цитологічних змін у гаметах трематоди, які проявляються дегенеративними формами клітин сперматогенного циклу, що важливо враховувати при вивченні цитологічних механізмів виникнення у фасціол біологічної резистентності до фасціолоцидних антигельмінтиків.

**Література**

1. Астафьев Б.А. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине / Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедева М.Н. – М.: Наука, 1989. – 259 с.
2. Бенедиктов И.И. Ингибирующие действия ароматических сульфидов, сульфоксидов и сульфонов на биохимические системы *Fasciola hepatica* / И.И. Бенедиктов // Мед.паразитол. и паразитарн. болезни. – М., 1975, Т. XLIV, № 4. – С. 474–477.
3. Бенедиктов И.И. Пути биологического и энергетического обмена у гельминтов и биохимический механизм действия антгельминтиков: автореф. дис. на соиск наук, степени докт. биол. наук : 03.00.20 "Паразитология", 03.00.04 "Биохимия" / И.И. Бенедиктов. – М., 1982. – 46 с.
4. Бенедиктов И.М. Транспорт электронов в митохондриях трематоды *Fasciola hepatica* / И.М.Бенедиктов // Тр. Все. Ин-та гельминтол. – М., 1971. – Т. XVII. – С. 57–62.
5. Дыбан А.П. Метод приготовления препаратов мейотических и митотических хромосом из семеников млекопитающих / А.П. Дыбан // Цитология. – М., 1969. – Т. 12, №5. – С. 687–689.
6. Курило Л.Ф. Цитогенетические и цитологические подходы к выявлению нарушений гамет / Л.Ф. Курило // Лабораторное дело. – М.: Медицина, – 1989. – С. 4–8.
7. Пенькова Р.А. Изучение хромосом трихинелл / Р.А. Пенькова, Л.Н. Романенко // Труды все. ин-та гельминтол., 1973. – Т. 20. – С. 133–142.
8. Соболта А.Г. Цитогенетичні та цитологічні дослідження сперматогенезу у *Fasciola hepatica* (Fasciolidae) / А.Г. Соболта // Наук. вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С.З. Гжицького. – Львів, 2004. – Т. 6. – Ч. 1. – С. 90–93.
9. Терская Е.Р. Приготовление давленых препаратов из окрашенных ацетокармином яиц тутового шелкопряда / Терская Е.Р. // Методы биологии развития. – М.: Наука, – 1974. – 519 с.
10. Ханбегян Р.А. Изучение действия антгельминтиков на фасциол / Р.А. Ханбегян // Тр. Всес. ин-та гельминтологии. – М., 1975. – Т. 22. – 177–184 с.
11. Stitt A.W. Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda:Digenea) / A.W. Stitt, I. Fairweather // Parasitology. – 1990. – № 101. – P. 395–407.

**Summary****Sobolta A.G.**

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology  
named after S.Z.Gzhytskyj*

**FASCIOLOCIDES EFFECT ON SPERMATOGENESIS  
FASCIOLA HEPATICA IN VITRO**

*They studied the impact of fasciolocides of brontel 10%, kombitrem as possible sources of cytological changes in *Fasciola hepatica* spermatogenous cycle cells, which is important to consider when studying the fascioles' mechanisms of developing resistance to fasciolocides antihelmintics.*

*Стаття надійшла до редакції 5.04.2010*