

УДК 636.09:616.99:636.4

Стибель В.В., д. вет. н., професор
Данко М.М., аспірант[©]*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького***ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННОГО ТА ГЕНОТОКСИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ
ISOSPORA SUIIS В ОРГАНІЗМІ ПОРОСЯТ**

Проведено дослідження з вивчення мутагенного та генотоксичного впливу *Isospora suis* за розвитку патологічного процесу в організмі поросят. За допомогою мікроядерного тесту встановлено, що у поросят, експериментально інвазованих ооцистами *I. suis* у дозі 50 000, зростала кількість еритроцитів з мікроядрами на 7-му та 14-ту добу інвазії. За визначення мутагенної активності гомогенату 50 000 інвазійних ооцист *I. suis* у тесті Еймса встановлено, що нативна концентрація індукувала реверсію на обох штаммах *Salmonella typhimurium*: TA-98 у 2,7 і TA-100 у 2,3 рази вищу, ніж у контролі. За розведення гомогенату інвазійних ооцист у 10 і 100 разів індукцію генних мутацій не виявлено. Отримані дані свідчать про те, що гомогенат інвазійних ооцист *I. suis* містить біологічно активні речовини, які володіють мутагенною активністю слабкої сили (за шкалою мутагенності 1 бал) і потенційно здатні індукувати зворотні генні мутації до гістидин незалежності в штаммах *S. typhimurium* TA-98 і TA-100 за типом зміщення рамки зчитування та типом заміни пар основ.

Ключові слова: *Isospora suis*, мутагенність, мікроядерний тест, тест Еймса, поросята.

Вступ. Одним з найбільш важливих генетичних аспектів взаємовідношень у системі паразит-хазяїн необхідно вважати мутаненний вплив паразита на спадковий апарат соматичних та генеративних клітин хазяїна.

Відомо, що найпростіші також володіють мутагенним впливом на спадковий апарат клітин хазяїна. G.K. Manna et al. встановили, що внутрішньочеревне введення мишам-альбіносам лінії Swiss культурального середовища *Entamoeba histolytica* стимулює підвищення хромосомних аберацій, кількості еритроцитів з мікроядрами у кістковому мозку [1].

За даними З.Н. Соболь і А.В. Степанова, у мишей, інвазованих *Lambia turis*, відмічають збільшення кількості еритроцитів з мікроядрами полі- та нормохроматофільних еритроцитів, а також аберантних, гіпоплідних, гіперплідних клітин лімфоїдного ряду в кістковому мозку [2, 3, 4]. Паразиткування *Leishmania donovani* у мишей викликає зміни числа хромосом, еритроцитів з мікроядрами, еритроцитів в кістковому мозку і призводить до збільшення сперматозоїдів зі зміною форми головки [5].

Мутагенний потенціал вірусів, бактерій та найпростіших є беззаперечним, внаслідок близького контакту з ядерним апаратом клітин ссавців і здатністю безпосередньо впливати на нього продуктами своєї життєдіяльності.

Цитогенетичні методи найчутливіші щодо встановлення мутагенного впливу чинників довкілля та дозволяють реєструвати зміни на хромосомному і геномному рівнях організації спадкової інформації [6]. Одним із цитогенетичних методів експрес-оцінки генетичної небезпеки ксенобіотиків *in vivo* у ссавців є мікроядерний тест [7]. Останнім часом цей метод отримав широке застосування у гуманній та ветеринарній медицині для визначення мутагенної дії чинників довкілля [8, 9] і рекомендований Міжнародним Агентством щодо захисту навколишнього середовища як високочутливий спосіб виявлення мутагенів і канцерогенів [10].

Мікроядро – це фрагмент ядра в еукаріотичній клітині, яке позбавлене повного геному, необхідного для її виживання. Воно є патологічною структурою і може спостерігатися в клітинах будь-яких тканин. Зазвичай мікроядра утворюються в результаті неправильного ходу клітинного поділу або фрагментації ядра в процесі апоптозу.

Мікроядерний тест у соматичних клітинах як скринінг-тест був запропонований у 70-х роках 20-го століття [11-14] для вивчення дії кластогенних і анеугенних чинників середовища на клітини кісткового мозку і периферичної крові. Він є відносно новим, але вже загальноприйнятим цитогенетичним методом оцінки мутагенної дії агентів різної природи. За допомогою цього методу проведено тестування на мутагенну активність великої кількості хімічних, фізичних і біологічних агентів, тест застосовується вже на першому етапі перевірки потенційних мутагенів і канцерогенів [15].

Тест Еймса – генетичний тест з використанням бактерій *Salmonella typhimurium* в якості тест об'єкту і призначений для оцінки мутагенного потенціалу хімічних сполук. Суть методу полягає в реєстрації здатності речовини, що досліджується, або її метаболітів, індукувати реверс-мутації від ауксотрофності до прототрофності за гістидином у тестерних штамів *S. typhimurium*, які несуть *his*-мутації і не здатні синтезувати гістидин. Методика була описана в ряді робіт на початку 1970-х років Брюсом Еймсом і його групою в Каліфорнійському Університеті [16, 17].

Ізоспороз є найбільш розповсюдженим протозойним захворюванням поросят-сисунів і завдає значних економічних збитків [18].

Метою наших досліджень було вивчення показників мікроядерного тесту в еритроцитах периферичної крові поросят-сисунів за розвитку експериментального ізоспорозу та визначення потенційної мутагенності гомогенату інвазійних ооцист *Isospora suis* у тесті Еймса.

Матеріал і методи. Для проведення експериментальних досліджень було відібрано по 8 поросят триденного віку з двох приплодів, з яких було сформовано, відповідно до загальних правил за принципом аналогів, дослідну та контрольну групу. Поросят дослідної групи заражали суспензією інвазійних ооцист *I. suis* у

кількості 50 000 на тварину. Накопичення, спорудження та визначення інвазійної дози проводили за методикою Long et al. (1976) з деякими модифікаціями [19].

Кров для досліджень з виявлення мікроядер в еритроцитах відбирали з вушної вени поросят до та на 7-му, 14-ту, 21-шу та 28-му добу після зараження. Виявлення мутагенної дії інвазійних ооцист *I. suis* за мікроядерним тестом проводили за методикою W. Schmid [14].

За визначення мутагенної активності гомогенату 50 000 інвазійних ооцист *I. suis* у тесті Еймса [20] дослідження проводили у трьох концентраціях – нативній, кратно зменшеній у 10 і 100 разів на штаммах *Salmonella typhimurium*: TA-98, який реєструє мутації за типом зміщення рамки зчитування і TA-100, який реєструє мутації за типом заміни пар основ. Наявність мутагенної дії враховували за індукцією обернених мутацій від аутокотрофності за гістидином до прототрофності. Для контролю у дослідах з метаболічною активацією для штаму TA-98 застосовували амінофлуорен, який вводили у концентрації 10 мкг/чашку та для штаму TA-100 циклофосфан, який вносився у кількості 100 мкг/чашку. Інкубацію проводили впродовж 48 годин.

Результати дослідження. Проведеним дослідженням з вивчення можливого мутагенного та генотоксичного ефекту *I. suis* за розвитку патологічного процесу в організмі поросят встановлено, що у поросят, експериментально інвазованих ооцистами *I. suis* у дозі 50 000, зростала кількість еритроцитів з мікроядрами (табл. 1). В еритроцитах периферичної крові мікроядра виявляли з різною частотою у неоднакові доби досліду. Статистично вірогідне зростання кількості еритроцитів спостерігали на 7-му та 14-ту добу експерименту. Максимальну кількість еритроцитів з мікроядрами було зафіксовано на 7-му добу дослідження – $7,4 \pm 1,04$, що у 5,3 рази перевищувало показник контрольної групи ($P < 0,001$). На 14-ту добу експерименту кількість еритроцитів з мікроядрами ($5,7 \pm 1,12$) була у 3,4 рази вищою, ніж у тварин контрольної групи ($P < 0,01$). На 21-шу та 28-му добу інвазії кількість еритроцитів з мікроядрами перевищувала показники контрольної групи поросят, відповідно, у 2,2 та 1,75 рази.

Таблиця 1.

Кількість еритроцитів із мікроядрами (ЕМЯ) у периферичній крові поросят, інвазованих ооцистами *I. suis*, ‰₀ (M±m, n=8)

Групи тварин	ЕМЯ/1000 еритроцитів				
	До інвазії	Після інвазування			
		7 доба	14 доба	21 доба	28 доба
Контрольна	0,8±0,07	1,4±0,16	1,7±0,26	1,9±0,38	1,2±0,44
Дослідна	0,6±0,03	7,4±1,04***	5,7±1,12**	4,2±0,96	2,1±0,54

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

За визначення мутагенної активності гомогенату 50 000 інвазійних ооцист *I. suis* у тесті Еймса (табл. 2) дослідження проводили у трьох концентраціях – нативній, кратно зменшеній у 10 і 100 разів. Встановлено, що нативна концентрація індукувала реверсію на обох штаммах *Salmonella typhimurium*: TA-98

у 2,7 і ТА-100 у 2,3 рази вищу, ніж у контролі. За розведення гомогенату інвазійних ооцист у 10 і 100 разів індукцію генних мутацій не виявлено.

Отримані дані свідчать про те, що гомогенат інвазійних ооцист *I. suis* містить біологічно активні речовини, які володіють мутагенною активністю слабкої сили (за шкалою мутагенності 1 бал) і потенційно здатні індукувати зворотні генні мутації до гістидин незалежності в штаммах *S. typhimurium* ТА-98 і ТА-100 за типом зміщення рамки зчитування та типом заміни пар основ.

Таблиця 2.

Мутагенна активність гомогенату інвазійних ооцист *I. suis* у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	Кількість колоній ревертантів			$\frac{\bar{X}}{n}$	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
				X ₁	X ₂	X ₃			
Гомогенат інвазійних ооцист <i>I. suis</i>	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	302	238	272	270,6± 12,2	12,3	2
			спонтанний рівень ревертантів	16	24	29	22,0± 2,1		
			1	63	51	62	58,7± 4,7	2,7	1
			0,1	47	24	51	40,7± 3,4	1,8	0
			0,01	36	32	28	32,0± 2,7	1,5	0
	ТА-100	азид Na	1,5 мкг/чашку	612	544	605	587,0± 10,1	10,7	2
			спонтанний рівень ревертантів	44	57	63	54,7± 3,7		
			1	116	122	132	123,3± 5,6	2,3	1
			0,1	89	74	85	82,7± 3,3	1,5	0
			0,01	62	87	64	71,0± 3,1	1,3	0

Висновки

1. У поросят, експериментально інвазованих ооцистами *I. suis* у дозі 50 000, статистично вірогідно зростала кількість еритроцитів з мікроядрами на 7-му та 14-ту добу інвазії.

2. Гомогенат інвазійних ооцист *I. suis* містить біологічно активні речовини, які володіють мутагенною активністю слабкої сили (за шкалою мутагенності 1 бал) і потенційно здатні індукувати зворотні генні мутації до гістидин незалежності в штаммах *S. typhimurium* ТА-98 і ТА-100 за типом зміщення рамки зчитування та типом заміни пар основ.

Література

1. Manna G.K., Sadhukhan A., Data S. Mutagenic potential of the human intestinal amoeba *Entamoeba histolytica* assayed in mice as model // *Cytology*.- 1991.- Vol. 56.- № 4.- P. 313-616.
2. Соболев З.Н. Анализ результатов микроядерного теста у аутбредных мышей, спонтанно инвазированных *Lamblia muris* / Соболев З.Н., Степанов А.В.; *Вестник Віцебскага дзярж уні-та*. – 1998. – Т. 10.- № 4. – С. 58-61.
3. Степанов А.В. Мутагенное влияние лямблий и их метаболитов // *Мед. Новости*.- 1999.- № 3.- С. 61-62.
4. Степанов А.В. Мутагенное влияние лямблий на соматические клетки хозяина // *Вестник БГУ*. - 2000. - Сер. 2.- № 3. - С. 54-56.
5. Manna G.K., Sarkar A.K. Mutagenic potential of human kala-azar hemoflagellate in mouse // *Curr. Sci. (India)*. - 1989. – Vol. 58.- № 22. – P. 1268-1271.
6. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. / *АМН СССР*. – М: Медицина, 1989. – 272 с.
7. Кужир Т.Д. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот / Под. ред. Р.И. Гончаровой. – Мн.: Тэхналогія, 1999. – 267 с.
8. Fenech M., Holland N., Chang W.P. et al. The Human MicroNucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans // *Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen*. – 1999. – Vol. 428. – P.271-283.
9. Kirsch-Volders M., Sofimi T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D. Report from the in vitro micronucleus Assay Working Group // *Mutat. Res. Envir. and Mol. Mutagen*. – 2000. – Vol. 35. – P. 167-172.
10. 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 // *Mutat. Res. Envir. and Mol. Mutagen*. – 1991. – Vol. 17.- Suppl. 19.- P. 83.
11. Boller K., Schmid W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chineschen Hamsters als in vivo-Test system. *Haematologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon* // *Humangenetik*.- 1970.- Vol. 11.- P. 35-54.
12. Heddle J. A rapid in vivo test for chromosomal damage // *Mutat. Res.*- 1973.- Vol. 18.- № 2.- P. 187-190.
13. Schmid W. The micronucleus test // *Mutat. Res.*-1975.-Vol. 31- № 1.- P. 9-16.
14. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis // *Chemical Mutagens; Principle and Methodes for their detection*. Edited by: A. Hollaende (Plenum, New York).- 1976.- Vol. IV.- Ch. 36.- P. 31-53.
15. Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность.- Томск: Изд. Томского ун-та, 1992.- 272 с.
16. Pounikar R., Dawande A.Y. Detection of potential carcinogens by Ames test // *Asiatic J. Biotech. Res.*- 2010.- Vol. 1.- P. 57-64.
17. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity

assay // *Mutat. Res.*- 2000.- Vol. 455.- P. 29–60.

18. Karamon J., Ziomko I., Cencek T. Inwazja *Isospora suis* u prosjat // *Med. Wet.*- 2007.- T. 63.- Nu. 12.- S. 1546-1550.

19. Long P.L., Joyner P.L., Millard B.J., Norton C.C. A guide to laboratory techniques in the study and diagnosis of avian coccidiosis // *Fol. Vet. Lat.*- 1976.- Vol. 6.- P. 201-207.

20. Tejs S. The Ames test: a methodological short review // *Envir. Biotech.*- 2008.- Vol. 4 (1).- P. 7-14.

Summary

A study of the mutagenic and genotoxic effects of Isospora suis during the development of a pathological process in piglet. Micronucleus test shows that in pigs experimentally infected by 50 000 invasive oocyst of I. suis, increased the number of erythrocytes with micronucleus on the 7th and 14th day of invasion. In determining the mutagenic activity of homogenate of 50 000 invasive oocyst I. suis in the Ames test revealed that the concentration of native induced reversal of both strains Salmonella typhimurium: TA-98 in 2,7 and TA-100 is 2,3 times higher than in controls. By breeding homogenate invasive oocyst in 10 and 100 times the induction of gene mutations have been identified. These data suggest that the infective homogenate of I. suis oocyst contains biologically active substances that possess mutagenic activity weak force (on a scale mutagenicity 1 point) and potentially able to induce reverse mutations to histidine independence in strains S. typhimurium TA-98 and TA-100 for type of shift reading frames and type of replacement pairs.

Key words: *Isospora suis, mutagenicity, micronucleus test, Ames test, piglets.*

Рецензент – д.вет.н., проф. Урбанович П.П.