

УДК 619: 616. 99: 576. 895: 619: 615

Соболта А.Г., к. вет. н., старший викладач ©

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З.Гжицького**ВПЛИВ ФАСЦІОЛОЦИДІВ НА МЕЙОЗ
FASCIOLA HEPATICA IN VITRO**

Виявлено, що бронтел 10 % та комбітрем in vitro впливають на статеві хромосоми мейотичного циклу Fasciola hepatica, що проявляється у них морфогенетичними змінами.

Ключові слова: фасціольоз, мейоз, антигельмінтики, резистентність, гаметогенез, морфогенетичні зміни, клітини.

Вступ. Мейоз – один із найбільш важливих та складно організованих клітинних процесів, які протікають в живих організмах, в тому числі і у фасціол. Його можна охарактеризувати, як спеціальний тип поділу статевих клітин, які диференціюються. В результаті особливостей цього типу поділу забезпечується редукція кількості хромосом, необхідна для здійснення статевого процесу.

На нашу думку, було доцільно визначити, які цитоструктури більш чутливі до дії фасціолоцидів, які більш стійкі до пошкоджуючої дії, до визначення класу антигельмінтиків, адже з гаметогенезом та ценогенезом фасціол пов'язана резистентність [8] і, це може мати певне значення, так як 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.

За спостереженнями деяких вчених [1], біля 30 % гамет в зитонеті – пахітені мають порушення кон'югації (з'єднання), яка виражається в аномаліях синапномемного комплексу – структури, специфічної для мейотичних хромосом стадії від зиготени до диплотени і зумовлюючої кон'югацію гомологічних батьківських хромосом. За останні роки накопичилися дані про те, що виникаючі в гаметах аномалії можуть проявлятися морфологічно і функціонально не відразу, а як пролонгований ефект пошкодження при заплідненні на перших етапах розвитку зиготи. Очевидно, що порушення ДНК мітохондрій, особливо в ооцитах, не може пройти безслідно для гамет і зигот, які розвиваються. Однак, такого роду дослідження в літературі не відображені. У зв'язку з наростанням виявлення резистентності паразитів, зокрема фасціол до антигельмінтиків, стає актуальною проблема механізмів виникнення і виявлення впливу антигельмінтиків на гамети, особливо на хромосомні аберації.

Матеріали та методика. Для вивчення мутагенної дії фасціолоцидних препаратів на репродуктивну систему, 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 фасціол на 0,5 л. розчину у стерильні посудини з розчинами різних концентрацій комбітрему та бронтелу 10 % на 24 години. Розчиняли препарати і вносили у розчин Хедон-Флейга у відповідності до терапевтичних доз [16] та наближених рівнів у крові. Комбітрем розводили у концентраціях 0,1; 0,05; 0,025; 0,012; 0,006; 0,003; 0,0015 мг/см³; бронтел 10 % відповідно – 1,2; 0,6; 0,3; 0,1; 0,07, 0,03 і 0,017 мг/см³. Нерозчинний у воді фасціолоцид – комбітрем розводили етиловим спиртом: до 10-ти мг препарату додавали 0,16 мл етилового спирту [3]. Одна посудина з паразитами без антигельмінтиків служила контролем. Після чого, гіпотонізацію, фіксацію та виготовлення тимчасових тиснених тотальних препаратів проводили згідно загальноприйнятих методик [1, 7, 12, 14, 15].

Препарати оцінювали методом порівняння, кожні 6, 12 та 24 години, нормальних та патологічних клітин мейотичного циклу у кожній фасціолі, зміни у яких були викликані дією фасціолоцидів. При вивченні мейозу, скористалися методиками Мюнцинга А., 1967, Баранова В.С. 1968, Рамаяя Л.К., 1969, Дибана А.П., 1969, Вельша У., 1976, Мамаєва Н.Н. 1980, Гетза П., 1980, Курила Л.Ф., 1980, 1989, Паушевої З.П., 1988. Критерієм для порівняння слугували клітини оброблених та необроблених фасціолоцидами гельмінтів у стадії профазі 1 та метафазі 1 мейозу: лептотени, зиготени, пахітени та диплотени [2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13]. Зміни полягали у морфологічно змінених статевих клітин мейозу що проявлялось їх набуханням та розходженням хромосом, порушенням нормальної структури клітин.

Клітини вивчали і фотографували за допомогою світлового мікроскопу "Jenamed - 2" (x400) та цифрової фотокамери "Sony W5"

Результати досліджень. Із проведених нами досліджень за дії фасціолоцидних препаратів, вдалося виявити деякі відмінності в морфології статевих клітин мейотичного циклу, у порівнянні із клітинами необроблених гельмінтів згаданими вище препаратами.

Так вже через 6 годин під дією бронтелу 10 % у дозі 0,3 мг/см³, як це видно з рис. 1 а, б, були виявлені зміни на стадіях лептотени та зиготени профазі 1 мейозу. З лептотени (рис. 1, в), починається профаза 1 мейозу, коли видно, що кожна хромосома, змінивши свою інтерфазну конформацію, переходить у конденсовану форму, утворюючи довге, тонке волокно з білковою осью ниткою. Кожна хромосома обома кінцями прикріплена до ядерної мембрани за допомогою спеціалізованої структури, званої прикріпним диском. Хоча кожна хромосома вже реплікувалась і складається з двох сестринських хроматид, ці хроматиди дуже тісно зближені, і тому кожна хромосома здається одиночною (окремі хроматиди непомітні аж до пізньої профазі □ до стадії диплотени чи диакінезу, стадії спарювання хромосом).

Моментом переходу лептотени в зиготену вважають початок синапсису - тісної кон'югації двох гомологів. Через 12 годин, також за дози 0,3 мг/см³ бронтелу 10 %, відбулися зміни у стадії пахітени (рис. 1, г).

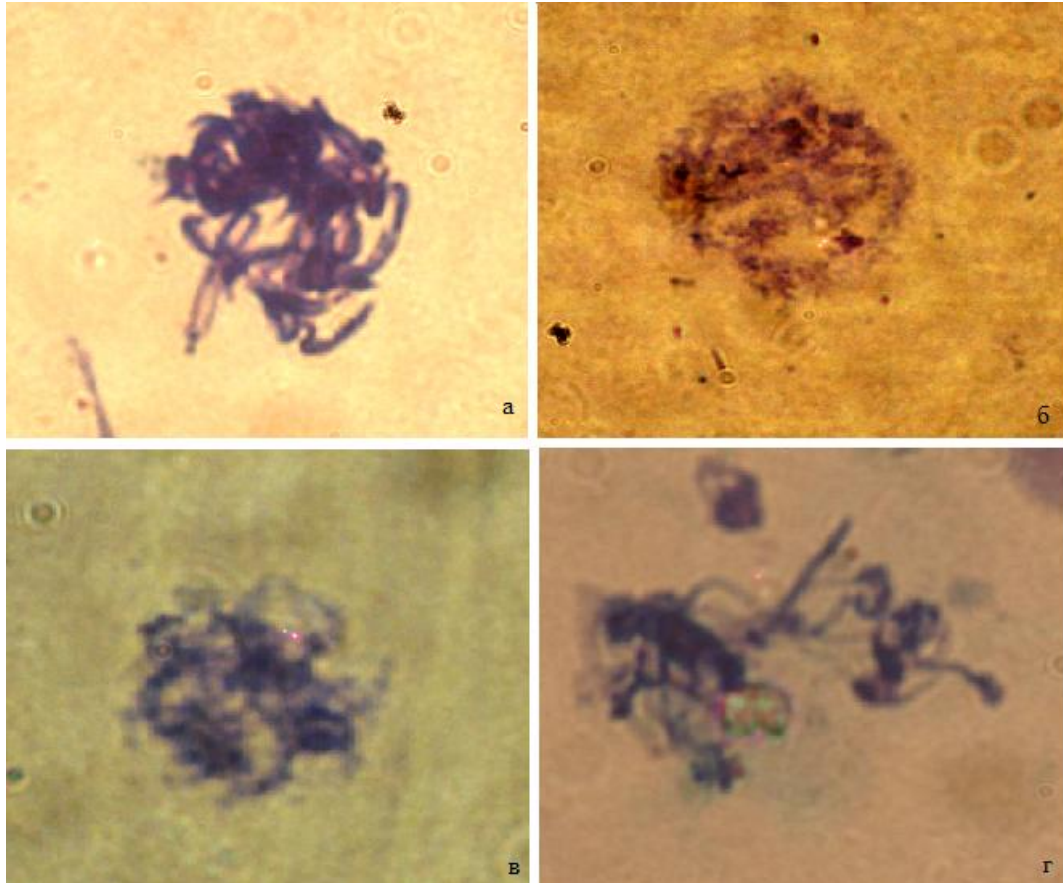


Рис. 1. а) вплив бронтелу 10 % (6 годин), порушення у структурі клітин лептотени; б) вплив бронтелу 10 % (6 годин), набухання хромосом в зиготені; в) клітина на стадії лептотени (норма); г) вплив бронтелу 10 % (12 годин), порушення структури пахітени. Фарбування ацетокарміном, зб. 10x100.

Пахітена це – стадія профазі 1 мейозу, на якій завершується спарювання гомологів. Хромосоми виглядають більш товстими, ніж у лептотені і зиготені. Як тільки завершується синапсис по всій довжині хромосом, клітини вступають у стадію пахітени, в якій вони можуть залишатися кілька діб. На цій стадії в повздовжній щілині синаптонемного комплексу з'являються великі рекомбінаційні вузлики, які відіграють важливу роль в обміні ділянками між хромосомами. Такі обміни призводять до перехрещень між двома несестринськими хроматидами: в обмінах бере участь по одній хроматиді з двох спарених хромосом. В пахітені перехрещення ще не видно, але пізніше всі вони виявляються у вигляді хіазм. Синапсис завершується, коли синаптонемні комплекси зв'язують

попарно всі гомологічні аутосоми. X- і Y- хромосоми кон'югують не цілком. Між хроматидами відбувається кросинговер.

Так як і за дії фасціолоцидів на сперматогенез фасціоли, відбувалися зміни, пов'язані із часом перебування паразитів у середовищах із різним вмістом антигельмінтиків, так і у експериментах за впливу на мейоз ми виявили відмінності за дії бронтелу 10 %, які відбувалися повільніше, за впливу комбітрему – відповідно швидше. За дози комбітрему 0,025 мг/см³ статеві клітини у стадії лептотени були більш розпушеними (набряклими), аніж за наближеного розведення бронтелу 10 % через той самий час. Ці деструкції були очевидними і у інших стадіях мейотичного поділу: зиготені, диплотені, пахітені.

За більших експозицій та за менших доз у розчинах з комбітремом та бронтелом 10 % фасціоли отримували нижчі концентрації препаратів і, відповідно, зміни у чоловічих статевих клітинах мейотичного поділу були менш виявленими.

За впливу комбітрему у дозі 0,006 мг/см³ упродовж 12 годин ми виявили порушення у стадії лептотени (рис.2, а), а через 24 години у дозі 0,0015 мг/см³ у зиготені (рис. 2, б) та за цієї ж дози у диплотені, стадії розбіжності хромосом, які втратили свою нормальну структуру (рис. 2, в). На цій стадії мейозу після пахітені і перед діакінезом диплотенні гомологічні хромосоми починають відштовхуватися і залишаються зв'язаними тільки в місцях хіазм.

Стадія диплотени в I профазі мейозу починається з поділу кон'югованих хромосом. Синаптонемний комплекс розпадається, що дозволяє двом гомологічним хромосомам біваленту трохи відсунутися одній від одної. Однак вони усе ще зв'язані однією чи декількома хіазмами, тобто місцями, де відбувся кросинговер. В ооцитах диплотена може розтягтися на місяці чи роки, тому що саме на цій стадії хромосоми конденсуються і синтезують РНК, забезпечуючи яйцеклітину резервними речовинами. В особливих випадках диплотенні хромосоми стають винятково активними у відношенні синтезу РНК, такі хромосоми, типу лампових щіток, знаходять в амфібій і деяких інших організмів. Перед руйнуванням білкових ниток останні відокремлюються одна від одної, що означає закінчення синапсису.

При подальшому цитогенетичному скринінгу у статевих клітинах фасціоли нам вдалося виявити клітини на стадії телофази 1, як це показано на рис. 2, г але змін в оброблених трематодах, на жаль, ми не встановили.

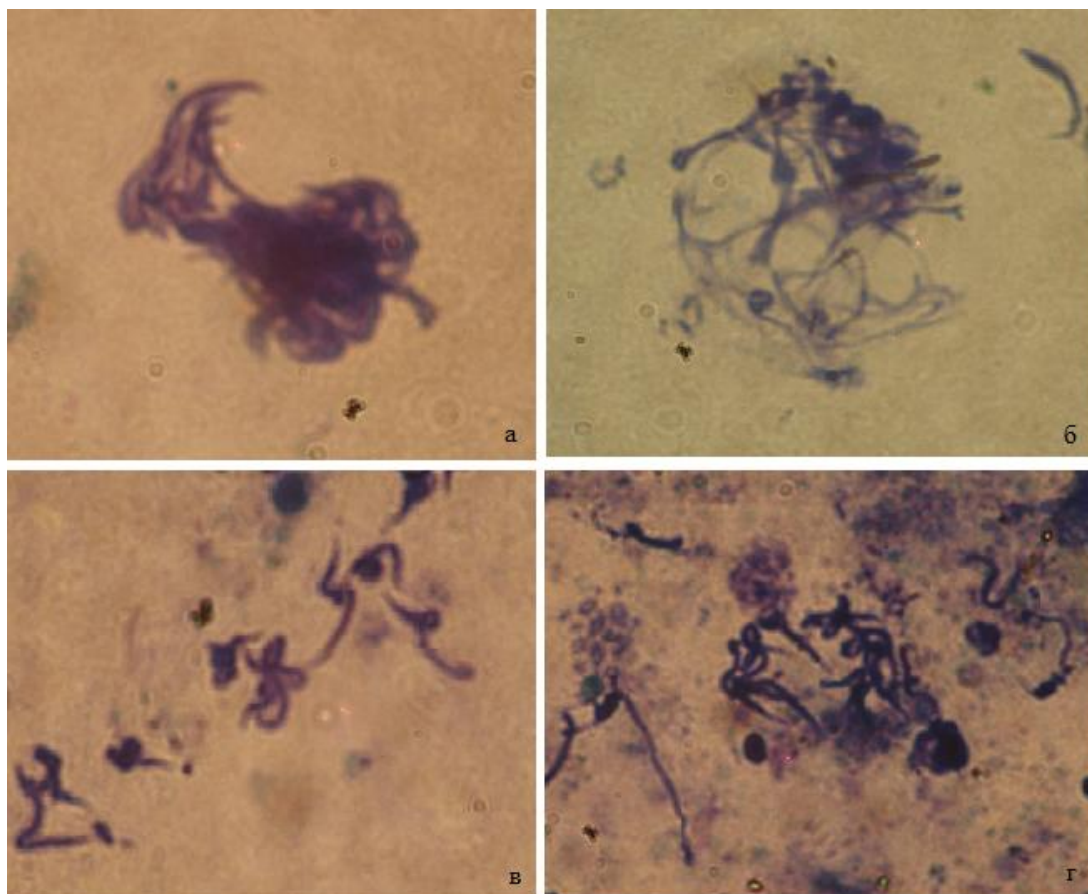


Рис. 2. а) вплив комбітрему (12 годин), порушення цитоструктури лептотени; б) вплив комбітрему (24 години), порушення цитоструктури зиготени; в) вплив комбітрему (24 годин), розходження хромосом в диплотені; г) стадія телофази 1 (норма). Фарбування ацетокарміном, зб.10x100

Отже, з отриманих нами даних за впливу фасціолоцидів *in vitro* на мейоз *Fasciola hepatica* можна зробити висновок, що бронтел 10 % та комбітрем впливають на статеві хромосоми мейотичного циклу, що проявляється у них морфогенетичними змінами.

Висновки.

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.

Вплив фасціолоцидних препаратів може бути джерелом цитологічних та цитогенетичних змін у гаметах трематоди, які проявляються морфогенетичними змінами у статевих хромосомах мейотичного поділу, що важливо враховувати

при вивченні генетичних механізмів виникнення у фасціол резистентності до фасціолоцидних антигельмінтиків.

На нашу думку, під впливом фасціолоцидів, порушення розвиваються як в цитоплазматичних, так і в ядерних структурах, в тому числі в хромосомах, індукуючи хромосомні і генні мутації. Мутації, що виникають у статевих клітинах, можуть передаватися наступним поколінням фасціол. Аналіз мейотичних клітин дозволяє встановлювати мейотичні мутації і тонкі порушення структури мейотичних хромосом на стадіях зиготени і пахітени профазы 1 мейозу, метафазы 1 і 2 мейозу.

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. Баранов В.С. Анализ нарушений сперматогенеза и эмбриогенеза у мышей / В.С. Баранов, А.П. Дыбан // Генетика, 1968. – Т.4., № 12. – С. 70–83.
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. Вельш У. Введение в цитологию и гистологию животных / У. Вельш, Ф. Шторх. – Москва: Мир, – 1976. – 271 с.
5. Гетз П. Хромосомные аберрации, индуцированные циклофосфамидом в мейотических клетках самцов мышей / П. Гетз, А.М. Малашенко, Н.И. Суркова // Цитология и генетика. – 1980. – Т. XIV, №4. – С. 29–35.
6. Дубинин Н.П. Цитологический анализ естественного мутационного процесса / Н.П. Дубинин, В.К. Щербаков, Л.Г. Дубинина, Г.Н. Кеслер // Цитология, – М., 1965. – №1(72). – С.23–28.
7. 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.
8. Курило Л.Ф. Цитогенетические и цитологические подходы к выявлению нарушений гамет / Л.Ф. Курило // Лабораторное дело. – М.: Медицина, – 1989. – С. 4–8.
9. Мамаев Н.Н. Изучение активности ядрышкообразующих районов хромосом нормальных, лейкозных и опухолевых клеток человека с помощью окрашивания азотнокислым серебром / Н.Н. Мамаев, С.Е. Мамаева, Д. Бенданадхайя, Н.В. Медведева // Цитология. – 1980. – Т.22, №2. – С. 161–165.
10. Мюнцинг А. Генетика общая и прикладная / Мюнцинг А. – М.: Мир, 1967. – 610 с.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / Паушева З.П. – Москва: Агропомиздат, – 1988. – 271 с.
12. Пенькова Р.А. Изучение хромосом трихинелл / Р.А. Пенькова, Л.Н. Романенко // Труды Всес. ин-та гельминтол., 1973. – Т. 20. – С. 133–142.
13. Рамайя Л.К. Цитогенетический эффект N-нитрозэтилмочевины,

гидроксиламина и рентгеновых лучей на половые клетки самцов мышей /Л.К.Рамайя // Генетика, 1969. – Том V, № 2. – С.74–86.

14. Соболта А.Г. Цитогенетичні та цитологічні дослідження сперматогенезу у *Fasciola hepatica* (Fasciolidae) / А.Г. Соболта // Наук. вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С.З.Гжицького. – Львів, 2004. – Т. 6. Ч 1. – С. 90–93.

15. Терская Е.Р. Приготовление давленых препаратов из окрашенных ацетокармином яиц тутового шелкопряда / Терская Е.Р.// Методы биологии развития. – М. : Наука, – 1974. – 519 с.

16. Ханбегян Р.А. Изучение действия антгельминтиков на фасциол / Р.А. Ханбегян // Тр. Всес. ин- та гельминтологии. – М., 1975. – Т.22. – 177–184 с.

Summary

Sobolta A.G.

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

INFLUENCE OF FASCIOLICIDES ON MEIOSIS OF FASCIOLA HEPATICA IN VITRO

*It was found that 10% brontel and kombitrem in vitro effect on the sex chromosomes of meiotic cycle of *Fasciola hepatica*, which is manifested in of these morphogenetic changes.*

Рецензент – д.вет.н., професор Стибель В.В.