

ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ ДІЇ *TOXOCARA CANIS* В ТЕСТІ ЕЙМСА

В. В. Стибель, О. Б. Прийма

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

Встановлено, що екскреторно-секреторні виділення токсокар, їх інвазійних яєць та личинок, а також гомогенати нематод проявляють мутагенну дію і можуть індукувати генні мутації як за типом зміщення рамки зчитування, так і за типом заміни пар основ.

Небезпечно для різних видів ссавців гельмінтозне захворювання, що спричиняється імагінальною і личинковою формами *Toxocara canis*, постійно привертає увагу дослідників у плані вивчення хазяїно-паразитних взаємовідносин як основи для вивчення патогенезу, діагностики і пошуку методів лікування тварин.

За останній час особливу увагу звертають на мутагенну небезпеку гельмінтів, на що вперше вказали Н. П. Дубінін і Ю. В. Пашин [5]. Незважаючи на те, що література, присвячена дослідженню складу екскреторно-секреторних виділень гельмінтів, досить чисельна, роботи про потенційну мутагенність гельмінтів, особливо нематод, відсутні. Механізм впливу екскреторно-секреторних продуктів гельмінтів на організм хазяїна невідомий і для його з'ясування поки що недостатньо даних, хоча більшість паразитологів, вивчаючи систему «паразит-хазяїн», посилається на їх токсичність. Однак, сам факт індукції мутагенності екскреторно-секреторними продуктами аскарисів та їх інвазійними яйцями у наших дослідах дає матеріал для обговорення. Більшість мікробних штамів і продуктів їх життєдіяльності, тестованих на мишах, індукують хромосомні аберації і мікроядра як в соматичних, так і в статевих клітинах. Паразитарні найпростіші можуть викликати цитогенетичні пошкодження як в соматичних клітинах, так і в клітинах репродуктивних органів хазяїв. Інвазія *Leishmania donovani* супроводжується збільшенням числа абераційних клітин у кістковому мозку і сперматозоїдах з порушеною морфологією головки у мишей, а при внутрішньочеревному введенні мишам-альбіносам лінії Swiss культурального середовища *Entamoeba histolytica* збільшується кількість абераційних клітин у кістковому мозку, первинних сперматозитах і кількість еритроцитів з мікроядрами. Мутагенним впливом на спадковий апарат соматичних клітин хазяїна володіють метаболіти опісторхів, шистосом, свинячого цип'яка, гіменолепісів, волосоголовців, трихінел, аскарисів і фасціол, що супроводжується збільшенням кількості анеуплоїдних клітин і клітин із хромосомними абераціями [2, 8–10]. Висловлено припущення, що високо-полімерні молекули, які входять до складу марит, і як чужорідні білки та ДНК і РНК здатні індукувати різні мутації [3].

Природа кінцевих продуктів метаболізму нематод остаточно ще не з'ясована. Більшість авторів вважає, що нематоди в якості кінцевого продукту обміну азоту утворюють аміак, сечову кислоту і сечовину [6]. Деякі автори підкреслюють, що секретри нематод складаються з ферментів і продуктів їх метаболізму, які в загальному відомі як екскреторно-секреторні антигени, що виділяються із анального або ротового отворів гельмінта і містять протеолітичні ферменти з антикоагулятивними властивостями, а також ацетилхолінестеразу, амілазу, протеїнази, РНК-азу, ДНК-азу та інші ферменти, які виділяються у просвіт кишечника хазяїна і можуть впливати на нього [14]. Проте, Б. А. Астаф'єв [1], на основі чисельних літературних даних вважає, що гельмінти виділяють порівняно нешкідливі протеїни або їх компоненти, і вони стають небезпечними лише після сенсibilізації організму піддослідних тварин. Доведено, що личинки нематод у період проникнення і міграції в організмі тварини викликають зміни в тканинах хазяїна,

продукують «фактор проникнення», який діє подібно до гіалуронідази [13]. Е. А. Дрюченко [4] вказує на можливість утворення гельмінтами токсичних амінів: кадаверину, путресцину і гістаміну. Ф. Ф. Сопрунов [7] відзначає, що ендopаразитичні гельмінти виділяють у навколишнє середовище етилендіамін, кадаверин, етаноламін, метиламін, пропіламін, бутиламін, аміламін, гептиламін, 1-аміно-2-пропанол, мурашину, оцтову, пропіонову, масляну, α -метилмасляну, валеріанову, α -метилкапронову і молочну кислоти. Із організму гельмінтів виділено також екдіозони і пептидні гормони [12]. Проведення досліджень саме в такому плані є актуальним і має теоретичне та практичне значення. Один з основних у скринінгу хімічних сполук, найбільш розповсюджений для визначення мутагенності є тест Еймса на *Salmonella thyphimurium* запропонований В. N. Ames et al. (1975), який дозволяє реєструвати наявність мутагенних властивостей рідини, яка тестується та її метаболітів, які формуються під впливом мікросомальних ферментів ссавців. Найкраще зарекомендували себе 2 штами — ТА-98 і ТА-100, які й найчастіше використовуються в дослідженнях.

Метою нашої роботи було вивчення можливої мутагенної дії екскреторно-секреторних продуктів токсакар та їх інвазійних яєць і личинок на генному рівні як типу заміни пар основ, так і типу зміщення рамки зчитування в тесті на *Salmonella thyphimurium*.

Матеріали і методи. Для вивчення мутагенної дії екскреторно-секреторних метаболітів *Toxosaga canis* використовували запропонований В. N. Ames et al. (1975) бактеріальний мутаційний тест [11]. З метою виявлення різних типів мутацій в експерименті використовували два тестерних штами *S. thyphimurium*: ТА-98 (his D 3052, rfa, Δ uvr B, +R), який реєструє мутації за типом зміщення рамки зчитування, і ТА-100 (his G 46, rfa, Δ uvr B, +R), який реєструє мутації за типом заміни пар основ. Наявність мутагенного ефекту враховували за індукцією обернених мутацій від ауксотрофності за гістидином до прототрофності. Суть методу полягає в реєстрації здатності речовини, що досліджується, та/або її метаболітів індукувати реверс-мутації від ауксотрофності до прототрофності за гістидином у тестерних штамів *S. thyphimurium*, які несуть his-мутації і не здатні синтезувати гістидин. Бактерії *S. thyphimurium* разом з препаратом, який досліджується, а також постмітохондріальним супернатантом гомогенату печінки шурів (фракція S-9) та Ко-факторами (НАДФ, глюкозо-6-фосфат) вносять в шар «верхнього» напіврідкого агару на Чашки Петрі. Під впливом ферментів мікросомального окислення, які містяться у фракції S-9, препарат може підлягати процесу біотрансформації з утворенням ряду метаболітів. Як сама речовина, так і її метаболіти, якщо вони мають мутагенну активність, індукують мутації у мікроорганізмів. Штами вирощували в термостаті при $t+37^{\circ}\text{C}$ на повноцінному середовищі: м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) і м'ясо-пептонному агарі (МПА, МПБ+1,5-2,0 % агару). Вказані середовища стерилізували в автоклаві при 0,5 атм. 30 хв (рН після стерилізації 7,0). Гомогенати готували із гельмінтів, вибраних із кишечника собак, шляхом заморожування і наступного подрібнення у водно-сольовому розчині за допомогою гомогенізатора Поттера (5000 об/хв при $t+4^{\circ}\text{C}$) з тефлоновим товчачиком. Для одержання екскреторно-секреторних метаболітів дорослі гельмінти та інвазійні яйця токсакар інкубували в стерильному фізіологічному розчині у термостаті при $t+30^{\circ}\text{C}$. Екстракти гомогенатів гельмінтів і продукти виділення стерилізували через фільтр Зейтца.

Результати та обговорення. За вивчення можливої мутагенної дії екскреторно-секреторних продуктів токсакар та їх інвазійних яєць і личинок на генному рівні як типу заміни пар основ, так і типу зміщення рамки зчитування в тесті на *Salmonella thyphimurium* визначали: мутагенну активність загального гомогенату із токсакар, мутагенну активність прижиттєвих виділень токсакар, мутагенну активність гомогенату інвазійних яєць і личинок у тесті Еймса. При визначенні мутагенної активності загального гомогенату токсакар (табл. 1) дослідження проводили у трьох концентраціях — нативній, кратно зменшеній у 10 і 100 разів. На штамів як ТА-98, так і ТА-100 нативна концентрація індукувала реверсію у 2–4 рази вищу, ніж у контролі. При розведенні гомогенату у 10 разів індукція генних мутацій виявлена лише на штамі ТА-98.

Таблиця 1

Мутагенна активність загального гомогенату токсокар у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	Кількість колоній ревертантів			\bar{X}	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
				X ₁	X ₂	X ₃			
Загальний гомогенат токсокар	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	289	292	302	294,3±3,2	11,3	2
			спонтанний рівень ревертантів	20	27	31	26,0±0,9		
			1	117	96	111	108,0±2,3	4,2	1
			0,1	109	98	105	104,0±1,9	4,0	1
			0,01	37	25	23	28,3±0,7	1,1	0
	ТА-100	азид Na	1,5 мкг/чашку	728	712	766	735,3±9,8	11,4	2
			спонтанний рівень ревертантів	74	55	64	64,3±0,8		
			1	157	175	112	148±3,2	2,3	0
			0,1	132	121	125	126±2,7	1,9	0
			0,01	92	98	87	92,3±1,9	1,4	0

При визначенні мутагенності прижиттєвих виділень токсокар (табл. 2) індукція реверсій виявлена у двох концентраціях на штамі ТА-98, а на штамі ТА-100 мутагенність зафіксована лише при нативній концентрації прижиттєвих виділень, при цьому перевищення кількості колоній у дослідах над контролем коливалась у межах 2–3 разів.

Таблиця 2

Мутагенна активність прижиттєвих виділень токсокар у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	Кількість колоній ревертантів			\bar{X}	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
				X ₁	X ₂	X ₃			
Прижиттєві виділення токсокар	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	282	304	264	283,3±3,3	15,7	2
			спонтанний рівень ревертантів	22	17	15	18,0±0,9		
			1	51	67	43	53,7±2,1	3,0	1
			0,1	47	44	55	48,7±1,4	2,7	1
			0,01	43	37	39	39,7±1,3	2,2	0
	ТА-100	Азид Na	1,5 мкг/чашку	733	676	598	669,0±7,4	11,5	2
			спонтанний рівень ревертантів	55	63	57	58,3±1,8		
			1	127	139	184	150,0±2,7	2,6	1
			0,1	67	88	97	84,0±2,1	1,4	0
			0,01	55	67	78	66,7±1,6	1,1	0

Це свідчить про те, що біологічні речовини, які виділялися токсокарами, мають здатність впливати на геном бактерій та спричиняти генні мутації як за механізмом зсуву рамки зчитування, так і за механізмом пар основ.

При визначенні мутагенної активності гомогенату інвазійних яєць токсокар виявлено (табл. 3), що у 100 % випадків зразки показали індукцію генних мутацій при нативній концентрації на штаммах ТА-98 і ТА-100. Це свідчить про те, що виділення яєць і їх вміст містять біологічно активні речовини, які здатні спричиняти мутації за типом заміни пар основ при збереженні мутагенності на рівні 1 бала.

Таблиця 3

Мутагенна активність гомогенату інвазійних яєць токсокар у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	Кількість колоній ревертантів			\bar{X}	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
				X ₁	X ₂	X ₃			
Гомогенат інвазійних яєць токсокар	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	307	298	276	293,7±4,3	10,6	2
			спонтанний рівень ревертантів	24	26	33	27,7±1,8		
			1	74	67	69	70,0±1,7	2,5	1
			0,1	52	34	42	42,7±1,9	1,5	0
			0,01	39	37	28	34,7±1,5	1,3	0
	ТА-100	азид Na	1,5 мкг/чашку	601	498	562	553,6±6,4	10,8	2
			спонтанний рівень ревертантів	53	44	57	51,3±1,7		
			1	112	127	158	132,3±2,4	2,6	1
			0,1	89	71	86	82,0±1,8	1,6	0
			0,01	61	68	57	62,0±1,4	1,2	0

Отже, виходячи з результатів досліджень у тесті Еймса, встановлено, що екскреторно-секреторні виділення токсокар, а також гомогенати нематод та інвазійних яєць виявляють мутагенну дію і можуть 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.

В И С Н О В К И

1. При визначенні мутагенної активності загального гомогенату токсокар як на штамі ТА-98, так і на штамі ТА-100 нативна концентрація індукувала реверсію в 2–4 рази вищу, ніж у контролі. При розведенні гомогенату в 10 разів індукція генних мутацій виявлена лише на штамі ТА-98.

2. При визначенні мутагенності прижиттєвих виділень токсокар індукція реверсій виявлена в двох концентраціях на штамі ТА-98, а на штамі ТА-100 мутагенність встановлена лише при нативній концентрації прижиттєвих виділень.

3. При визначенні мутагенної активності гомогенату інвазійних яєць токсокар виявилось, що у 100 % випадків зразки показали індукцію генних мутацій при нативній концентрації. При цьому реверсії виявлено як на штамі ТА-98, так і на штамі ТА-100.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення генотоксичної і цитотоксичної дії життєвих виділень гельмінтів на клітини ссавців за мікстинвазій.

ESTIMATION OF MUTAGENIC ACTION OF TOXOCARA CANIS IN THE TEST OF AMES

V. V. Stybel, O. B. Prijma

S U M M A R Y

It is set, that excretory-secretory excretions of toxocara, and also homogenat of helminths and infective eggs shows the mutagene action and can induce the genes mutations both after the mechanism of frameshift and by replacement of pair of bases.

ОЦЕНКА МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ TOXOCARA CANIS В ТЕСТЕ ЕЙМСА

В. В. Стибель, О. Б. Прыйма

АННОТАЦІЯ

Установлено, що екскреторно-секреторні виділення, токсокар, а також гомогенати нематод і їх інвазійних яєць проявляють мутагенне діяння і можуть індуктувати генні мутації як за механізмом сдвига рамки считывания, так і заміною пар основ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Астафьев Б. А. Очерки по общей патологии гельминтозов человека / Б. А. Астафьев. — М. : Медицина, 1975. — 287 с.
2. Бекиш В. Я. Состояние генома хозяина при гельминтозах / В. Я. Бекиш, О.-Я. Л. Бекиш. — Витебск : Изд. ВГМУ, 2004. — 218 с.
3. Гершензон С. М. Вызывание летальных мутаций с помощью препаратов ДНК у дрозофилы / С. М. Гершензон // Журн. общей биол. — 1964. — Т. 25. — С. 371–374.
4. Дрюченко Е. А. Образование кадаверина у некоторых представителей гельминтов рыб в печени и кишечнике их хозяев : В кн. : Гельминтозы в пресноводных биоценозах / Е. А. Дрюченко. — М. : Наука, 1982. — С. 81–85.
5. Дубинин Н. П. Мутагены и окружающая среда / Н. П. Дубинин, Ю. В. Пашин. — М., 1978. — 127 с.
6. Кротов А. И. Основы экспериментальной терапии гельминтозов / А. И. Кротов. — М. : Медицина, 1973. — 271 с.
7. Сопрунов Ф. Ф. Молекулярные основы паразитизма / Ф. Ф. Сопрунов. — М. : Наука, 1987. — 223 с.
8. Стибель В. В. Визначення мутагенної активності *Oesophagostomum dentatum* в тесті Еймса / В. В. Стибель // Науково-технічний бюлетень інституту біології тварин УААН і Державного науково-дослідного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2005. — Вип. 6, № 2. — С. 207–211.
9. Стибель В. В. Вивчення мутагенної дії *Trichuris suis* в тесті Еймса / В. В. Стибель // Вісник зоології. — Севастополь-Ласпі, 2005. — Вип. 19, ч. 2. — С. 327–329.
10. Стибель В. В. Оцінка мутагенної дії *Ascaris suum* в тесті Еймса / В. В. Стибель // Проблеми екології ветеринарної медицини Житомирщини. — Житомир, 2005. — С. 172–175.
11. Фонштейн Л. М. Методические рекомендации по применению теста Эймса Salmonella (микросомы) / Л. М. Фонштейн, С. К. Абилов. — М. : Изд-во МЗ СССР, 1983. — 21 с.
12. Eliser B. Method for immunization against and treatment of infection by ectoparasites and endoparasites / B. Eliser, R. I. Scibinski, S. Crimes // Apton. Corp. — No 96695, pat. 48412119 USA. — 02.01.90.
13. Lee D. L. The physiology of nematodes : 2-nd edition / D. L. Lee, H. I. Atkinson. — Mac/Millan Press Ltd., London and Basingstoke, 1976. — 215 p.
14. Miller H. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals / H. Miller. — Advances in veterinary immunology, 1983. ELSEVIER. — Amsterdam–Oxford–New York–Tokyo, 1984.

Рецензент: доктор ветеринарних наук, професор Н. М. Сорока, Національний університет біоресурсів і природокористування України.