

ПОКАЗНИКИ МІКРОЯДЕРНОГО ТЕСТУ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕТЕРАКОЗУ КУРЕЙ

М. В. Голубцова, В. В. Стибель

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

Проведені нами дослідження показали, що личинки гетеракісів та їх зажиттєві виділення викликають мутагенні зміни соматичних клітин курей, які призводять до вірогідного збільшення кількості еритроцитів із мікроядрами, а також збільшення розмірів мікроядер, що, можливо, пов'язано з високою біологічною активністю паразитів і виділенням великої кількості ксенобіотиків безпосередньо у тканини хазяїна.

Мікроядерне тестування — один з ефективних методів, який дозволяє визначити сумарну дію мутагенів на структуру хромосом і виявити генетичні зміни у конкретної особи [1, 2]. Хронічна дія несприятливих факторів на організм призводить до порушення цитогенетичної стабільності і накопиченню хромосомних аномалій в клітинах організму [3].

Утворення у клітині мікроядер пов'язують із пошкодженням молекули ДНК і хромосомних білків. Мікроядерний тест є чутливим методом оцінки генотоксичної дії речовин і для виявлення такої дії вважається перспективним [4, 6, 9].

Метою нашої роботи було вивчення впливу зажиттєвих виділень личинок *Heterakis gallinarum* на показники мікроядерного тесту курей породи Хайсекс, залежно від дози ураження та часу від початку інвазії.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на 32 курях, живою масою 1000–1200 г. Яйця отримували від статевозрілих гетеракісів та культивували до інвазійної стадії за методикою, описаною Г. А. Котельніковим [5]. Яйця отримували з гонад самок гетеракісів і культивували в 0,1% розчині сульфатної кислоти у термостаті за 20 °C протягом 35 діб. Птицю розділили на 4 групи по 8 особин у кожній. Курей першої групи заражали в дозі 100 інвазійних яєць, другої — 500 інвазійних яєць, третьої — 2500 інвазійних яєць *H. gallinarum* на 1 курку. Кури четвертої групи слугували інтактним контролем. Суміш яєць у 2 % крохмальному гелі з необхідною концентрацією в об'ємі 0,2 мл вводили птиці за допомогою резинового зонду. Контрольній групі птиці вводили 2 % крохмальний гель в об'ємі 0,2 мл. Визначення змін в еритроцитах проводили на 3, 10, 21, 42 добу від інвазування за допомогою постановки мікроядерного тесту за методикою W. Schmid [7, 8]. Мікропрепарати фіксували в метанолі та зафарбовували фарбником Гімза, виробництва фірми Sigma. Встановлювали кількість утворених мікроядер в 1000 підрахованих еритроцитах кожного препарату.

Результати дослідів підлягали біометричній обробці із застосуванням комп'ютерної програми з урахуванням на виході показника середньої квадратичної, коефіцієнту варіації, критерію вірогідності та коефіцієнту кореляції, подані в одиницях міжнародної системи СІ. Застосовували комп'ютер Pentium IV з використанням статистичного програмного пакету, рівень вірогідності визначали за таблицею Стьюдента. Всі показники, що перебували в межах від 0,001 до 0,05 %, визнавали як вірогідні.

Результати й обговорення. При вивченні крові контрольної групи курей за розвитку гетеракозу встановлено, що протягом 42 діб дослідження частота утворення одноподібних еритроцитів коливалась від $1,5 \pm 0,27$ до $1,8 \pm 0,31$ у 1000 еритроцитах (%), двоподібних — від $1,4 \pm 0,18$ до $1,6 \pm 0,32$ і триподібних — від $0,1 \pm 0,61$ до $0,2 \pm 0,41$ у 1000 еритроцитах (табл.).

**Кількість еритроцитів з мікроядрами у периферичній крові курей,
інвазованих яйцями *Heterakis gallinarum*, ‰ (M±m, n=8)**

Доби дослідів	Тип еритроцитів з мікроядрами	Групи курей			
		контрольна	дослідні		
			100 інвазійних яєць/курку	500 інвазійних яєць/курку	2500 інвазійних яєць/курку
3	одноядерні	1,8±0,31	4,2±0,96*	8,3±1,93**	10,4±0,83***
	двоядерні	1,5±0,32	2,1±0,56	3,2±0,75*	5,8±1,16**
	триядерні	0,1±0,61	0,3±1,12	0,5±0,68	0,7±0,36
10	одноядерні	1,6±0,26	4,7±0,78**	8,0±0,82***	11,1±1,59***
	двоядерні	1,4±0,18	2,7±0,49*	4,2±0,76**	6,2±1,51**
	триядерні	0,2±0,41	0,4±0,86	1,4±0,84	1,5±0,74
21	одноядерні	1,5±0,27	5,3±1,6*	9,6±1,12***	12,3±2,06***
	двоядерні	1,4±0,26	3,5±0,46**	4,4±0,92**	7,3±1,62**
	триядерні	0,1±0,95	0,6±0,92	1,2±1,02	1,5±1,4
42	одноядерні	1,6±0,26	4,6±1,25*	8,4±1,36***	10,0±2,26**
	двоядерні	1,6±0,32	3,7±0,91*	3,8±0,91*	6,2±1,36**
	триядерні	0,2±0,15	0,4±0,22	0,6±1,31	1,1±0,85

Примітки: ступінь вірогідності: P < 0,001***, P < 0,01**, P < 0,05*

У інвазованих гетеракісами курей встановлено збільшення кількості еритроцитів із мікроядрами. При зараженні у кількості 100 інвазійних яєць гетеракісів на 1 курку на третю добу від початку експерименту показник частоти однадерних еритроцитів (4,2±0,96) був у 2,3 рази більшим, ніж у контрольній групі (P<0,05). Кількість двоядерних еритроцитів, порівняно з контролем, зросла в 1,4 рази (2,1±0,56), кількість триядерних еритроцитів становила 0,3±1,12 у 1000 еритроцитах (‰).

На 10-ту добу експерименту кількість однадерних еритроцитів становила 4,7±0,78, що у 3 рази більше, ніж у контролі. Кількість двоядерних еритроцитів перевищувала контроль у 2 рази (P<0,05).

На 21-ту добу встановлено підвищення кількості однадерних еритроцитів до максимального показника — 5,3±1,6, що в 3,5 рази перевищував показники контролю, частота двоядерних еритроцитів на 20-ту добу досягла свого максимального рівня (3,5±0,46 в 1000 еритроцитах) і перевищувала контроль у 2,5 рази (P<0,01). Кількість триядерних еритроцитів, порівняно з контролем, значно зросла і становила 0,6±0,92 на 1000 еритроцитів.

На 42-гу добу інвазії кількість однадерних еритроцитів значно знизилась і становила 4,6±1,25 на 1000 еритроцитів. Частота двоядерних еритроцитів знизилась до показника 3,7±0,91 і у 2,3 рази перевищувала показник контролю (P<0,05). Показник чисельності триядерних еритроцитів у 2 рази перевищував контроль і становив 0,4±0,22.

При зараженні курей у кількості 500 інвазійних яєць на 1 курку до 3-ї доби частота виявлення однадерних еритроцитів перевищувала контрольний показник у 4,6 рази (P<0,01). Частота дво- та триядерних еритроцитів зросла у 2,1 та 5 разів, відповідно.

На 10-ту добу в інвазованих курей кількість однадерних еритроцитів зросла і, порівняно з контролем, була вищою у 5 раз і становила 8,0±0,82 на 1000 клітин. Встановлено вірогідне збільшення і двоядерних еритроцитів, яке зросло у 3 рази (4,2±0,76), у порівнянні з контролем (P<0,01), частота триядерних становила 1,4±0,84 на 1000 клітин.

До 21-ї доби спостереження кількість однадерних еритроцитів перевищувала контрольний показник у 6,4 рази (P<0,001), двоядерних еритроцитів — у 3,2 рази (P<0,01), триядерних еритроцитів — у 1,3 рази.

На 42-гу добу інвазії кількість еритроцитів з одним ядром була в 5,3 рази вищою, порівняно до контролю ($P<0,001$). Частота виявлення двоядерних еритроцитів перевищувала контрольний показник в 2,4 рази і становила $3,8\pm0,91$, кількість триядерних еритроцитів дещо знизилась, проте була у 3 рази більша, ніж у контролі ($0,6\pm1,31$).

При підвищенні зараження до кількості 2500 яєць на 1 курку до 3-ї доби інвазії частота одноядерних еритроцитів перевищувала у 5,8 рази показники контрольної групи курей. Частота двоядерних еритроцитів становила $5,8\pm1,16$, що у 3,9 рази перевищувало контрольний показник. Кількість триядерних еритроцитів збільшилась у 7 разів ($0,7\pm0,36$).

До 10-ї доби інвазії кількість одноядерних еритроцитів вірогідно перевищувала у 6,9 рази цей показник у контрольній групі ($P<0,001$). У 4,4 рази зросла кількість двоядерних еритроцитів по відношенню до контрольної групи ($P<0,01$), а кількість триядерних еритроцитів перевищувала показник контролю у 7,5 рази і становила $1,5\pm0,74$ на 1000 клітин.

На 21-ту добу досліду частота виявлення одноядерних еритроцитів продовжувала наростати і складала $12,3\pm2,06$ ‰ ($P<0,001$). Кількість двоядерних еритроцитів була в 5,2 рази вищою, порівняно до контролю ($P<0,01$), кількість триядерних еритроцитів зросла в 15 разів і становила $1,5\pm1,4$ ‰.

На 42-ту добу спостерігалось незначне зниження показників. Кількість одноядерних еритроцитів становила $10,0\pm2,26$ ‰, що у 6,3 рази перевищувало показник контрольної групи. Показник частоти виявлення двоядерних еритроцитів перевищував контрольний у 3,9 рази ($P<0,01$). У 5,5 разів, у порівнянні з контролем збільшилась кількість триядерних еритроцитів і становила $1,1\pm0,85$ на 1000 клітин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що за експериментального ураження гетеракозом курей виявляється мутагенна дія на хромосомний апарат соматичних клітин хазяїна, що призводить до вірогідного збільшення кількості еритроцитів з мікроядрами.

2. Найбільш виражені цитогенетичні порушення встановлені у період активної міграції личинок гетеракісів і залежать від дози інвазійного матеріалу та вірогідно зростають за її збільшення.

3. Зниження кількості мікроядер в еритроцитах, очевидно, є наслідком зменшення екскреторно-секреторних виділень личинками, спричинене зниженням їх біологічної активності та елімінацією їх із кишечника.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення генотоксичної і цитотоксичної дії зажиттєвих виділень гельмінтів на клітини курей за асоціативних інвазій.

INDICATORS OF MICRONUCLEUS TEST FOR CHICKENS EXPERIMENTAL HETERACOSIS

M. V. Golubtsova, V. V. Stybel

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskiy

S U M M A R Y

Past research has shown that the heteracises larvae and their intravital exudation cause mutagenic changes in somatic cells of chickens, leading to the likely increase in the number of erythrocytes with micronuclei, as well as increasing the size of micronuclei, which may be associated with high biological activity of parasites and by a large number of xenobiotics directly into the host tissue.

ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕТЕРАКОЗЕ КУР

М. В. Голубцова, В. В. Стибель

Львовский национальный университет ветеринарной медицины
и биотехнологий имени С. З. Гжицкого

А Н Н О Т А Ц И Я

Установлено, что личинки гетеракисов и их прижизненные выделения вызывают мутагенные изменения соматических клеток кур, которые приводят к достоверному увеличению количества эритроцитов с микроядрами, а также увеличения размеров микроядер, что, возможно, связано с высокой биологической активностью паразитов и выделением большого количества ксенобиотиков непосредственно в ткани хозяина.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды / АМН СССР. — М: Медицина, 1989. — 272 с.
2. Ильинских Н. Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов / Н. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, В. Н. Некрасов // Цитология и генетика. — 1988. — Т. 22, № 7. — С. 67–72.
3. Ильинских Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н. Н. Ильинских, В. В. Новицкий, Н. Н. Ванчугова, И. Н. Ильинских // Томск: Изд-во Том. Ун-та, 1992. — 272 с.
4. Козиней Г. И., Макаров В. А. Исследования системы крови в клинической практике. — М.: Триада-Х, 1997. — 480 с.
5. Котельников Г. А. Гельминтологические исследование животных и окружающей среды. — М.: Колос, 1984. — 128 с.
6. Heddle J. A rapid in vivo test for chromosomal damage // Mutat. Res. — 1973. — Vol. 18, N 2. — P. 187–190.
7. Schmid W. The micronucleus test // Mutat. Res. — 1975. — Vol. 31, № 1. — P. 9–16.
8. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis // Chemical Mutagens; Principle and Methodes for their detection. Edited by: A. Hollaende (Plenum, New York). — 1976. — IV, N. 36. — P. 31–53.
9. Yamamoto K., Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons // Mutat. Res. — 1980. — Vol. 71. — P. 127–131.

Рецензент — доктор ветеринарных наук, професор Н. М. Сорока, Національний університет біоресурсів і природокористування України.