

УДК 619:616.99:636.5

ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ООЦИСТ ЕЙМЕРІЙ КУРЕЙ У ТЕСТІ ЕЙМСА

В. В. Стибель¹, А. Ю. Гірковий¹, М. М. Данко²
andriyhirkovyy87@gmail.com

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького,
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

Проведено дослідження з вивчення мутагенного впливу інвазійних ооцист еймерій курей (*Eimeria maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*) у тесті Еймса. Суть методу полягає в реєстрації здатності речовини, що досліджується, або її метаболітів індукувати реверс-мутації від ауксотрофності до прототрофності за гістидином у тестерних штамах *Salmonella typhimurium*, які несуть *his*-мутації і не здатні синтезувати гістидин.

Дослідження проводили у трьох концентраціях — нативній, кратно зменшеній у 10 і 100 разів. За визначення мутагенної активності інвазійних ооцист *E. maxima*, *E. tenella* та *E. necatrix* встановлено, що нативна концентрація індукувала реверсію на обох штаммах *S. typhimurium* вища, ніж у контролі: TA-98 — у 2,4 і TA-100 — у 2,3 разу. Нативна концентрація гомогенату інвазійних ооцист *E. acervulina* індукувала реверсію на обох штаммах: TA-98 — у 2,5 і TA-100 — у 2,3 разу вищу, ніж у контролі. За розведення гомогенату інвазійних ооцист *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* та *E. acervulina* у 10 і 100 разів індукцію генних мутацій не виявлено.

Отримані дані свідчать про те, що гомогенат інвазійних ооцист еймерій курей (*E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*) містить біологічно активні речовини, які володіють мутагенною активністю слабкої сили (1 бал за шкалою мутагенності) і потенційно здатні індукувати зворотні генні мутації до гістидин-незалежності в штаммах *S. typhimurium* TA-98 і TA-100 за типом зміщення рамки читування і типом заміни пар основ.

Ключові слова: КУРИ, ЕЙМЕРІЇ, ООЦИСТИ, ТЕСТ ЕЙМСА, МУТАГЕННІСТЬ

ASSESSMENT OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF OOCYSTS OF CHICKENS EIMERIA IN AMES TEST

V. V. Stybel¹, A. Y. Hirkovyy¹, M. M. Danko²
andriyhirkovyy87@gmail.com

¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named
after S. Z. Gzhytskyj,
50 Pekarska str., Lviv 79010, Ukraine

²State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11 Donetska str., Lviv 79019, Ukraine

The mutagenic effects of infective oocysts of chickens eimeria (*Eimeria maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*) was studied using the Ames test. The method consists in recording the ability of the test substance or its metabolites induce reverse mutations from auxotrophy to prototrophy for histidine in the test strain *Salmonella typhimurium*, who are *his*-mutation and are not able to synthesize histidine.

The studies were conducted at three concentrations — native, diluted in 10 and 100 times. In determining the mutagenic activity of infective oocysts of *E. maxima*, *E. tenella* and *E. necatrix* found that native concentration induced reversion to both strains *S. typhimurium*: TA-98 2,4 and TA-100 2,3 times higher than in the control. The native concentration of homogenate infective *E. acervulina* oocysts induce reversion to both strains TA-98 2,5 and TA-100 2,3 times higher than in controls. By dilution of the homogenate

of infective oocysts of *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* and *E. acervulina* in 10 and 100 times the induction of gene mutations were detected.

These data suggest that the infective homogenate of of infective oocysts of chickens eimeria 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.

Keywords: CHICKENS, EIMERIA, OOCYSTS, AMES TEST, MUTAGENICITY

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ООЦИСТ ЭЙМЕРИЙ КУР В ТЕСТЕ ЭЙМСА

В. В. Стибель¹, А. Ю. Гирковский¹, Н. Н. Данко²
andriyhirkovyy87@gmail.com

¹Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицкого,
ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

²Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок,
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

Проведено исследование по изучению мутагенного воздействия инвазионных ооцист эймерий кур (*Eimeria maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*) в тесте Эймса. Суть метода заключается в регистрации способности вещества исследуемого или его метаболитов индуцировать реверс-мутации от аукоτροφности к прототрофности по гистидину в тестерных штаммах *Salmonella typhimurium*, которые несут *his*-мутации и не способны синтезировать гистидин.

Исследования проводились в трех концентрациях — нативной, кратно уменьшенной в 10 и 100 раз. При определении мутагенной активности инвазионных ооцист *E. maxima*, *E. tenella* и *E. necatrix* установлено, что нативная концентрация индуцировала реверсии на обоих штаммах *S. Typhimurium* выше, чем в контроле: TA-98 — в 2,4 и TA-100 — в 2,3 раза. Нативная концентрация гомогената инвазионных ооцист *E. acervulina* индуцировала реверсии на обоих штаммах: TA-98 — в 2,5 и TA-100 — в 2,3 раза выше, чем в контроле. При разведении гомогената инвазионных ооцист *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* и *E. acervulina* в 10 и 100 раз индукцию генных мутаций не обнаружено.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гомогенат инвазионных ооцист эймерий кур (*E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*) содержит биологически активные вещества, которые обладают мутагенной активностью слабой силы (1 балл по шкале мутагенности) и потенциально способны индуцировать обратные генные мутации к гистидин-независимости в штаммах *S. typhimurium* TA-98 и TA-100 по типу смещения рамки считывания и типу замены пар оснований.

Ключевые слова: КУРЫ, ЭЙМЕРИИ, ООЦИСТЫ, ТЕСТ ЭЙМСА, МУТАГЕННОСТЬ

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

Відомо, що найпростіші також мають мутагенний вплив на спадковий апарат клітин хазяїна. Встановлено, що внутрішньочеревне введення мишам-альбіносам лінії Swiss культурального середовища *Entamoeba histolytica* стимулює підвищення хромосомних аберацій, кількості еритроцитів з мікроядрами у кістковому мозку [1]. У мишей, інва-

зованих *Lambliа muris*, спостерігають збільшення кількості еритроцитів з мікроядрами політа нормохроматофільних еритроцитів, а також аберантних, гіпоплоїдних, гіперплоїдних клітин лімфоїдного ряду в кістковому мозку [2–4]. Паразитовання *Leishmania donovani* у мишей спричиняє зміни числа хромосом, еритроцитів з мікроядрами, еритроцитів у кістковому мозку і призводить до збільшення сперматозоїдів зі зміною форми головки [5]. Під час досліджень встановлено, що інвазія кокцидій *Isospora suis* сприяє зростанню кількості еритроцитів з мікроядрами у поросят,

а гомогенат інвазійних ооцист ізоспор містить біологічно активні речовини з мутагенною активністю слабкої сили [6].

Тест Еймса — генетичний тест з використанням бактерій *Salmonella typhimurium* як тест-об'єкту, призначений для оцінки мутагенного потенціалу хімічних сполук. Методика була описана в низці робіт на початку 1970-тих років Брюсом Еймсом і його групою в Каліфорнійському Університеті, Берклі [7, 8].

Еймеріози є найбільш поширеними протозойними захворюванням курей і завдають значних економічних збитків [9]. Відомо про різносторонній патогенний вплив збудників еймерій на фізіологічні процеси в організмі курей, однак дані щодо їх потенційної мутагенної дії були відсутні.

Метою наших досліджень було визначення потенційної мутагенності гомогенату інвазійних ооцист еймерій курей (*Eimeria maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*) у тесті Еймса.

Матеріали і методи

Для вивчення мутагенної дії продуктів життєдіяльності еймерій використовували бактеріальний мутаційний тест Еймса [10]. З метою виявлення різних типів мутацій

в експерименті використовували два тестерних штами *Salmonella typhimurium*: ТА-98, який реєструє мутації за типом зміщення рамки зчитування, і ТА-100, 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. typhimurium*, які несуть *his*-мутації і не здатні синтезувати гістидин. Бактерії *S. typhimurium* разом із препаратом, який досліджується, а також постмітохондріальним супернатантом гомогенату (фракція S-9) та Ко-факторами (НАДФ, глюкозо-6-фосфат) вносять у шар «верхнього» напіврідкого агару на Чашки Петрі. Під впливом ферментів мікосомального окислення, які містяться у фракції S-9, препарат може підлягати процесу біотрансформації з утворенням низки метаболітів. Як сама речовина, так і її метаболіти, якщо вони мають мутагенну активність, індукують мутації у мікроорганізмів. Штами вирощували у термостаті за $t + 37^{\circ}\text{C}$ на повноцінному середовищі: м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) і м'ясо-пептонному агарі (МПА, МПБ+1,5–2,0 % агару). Вказані сере-

Таблиця 1

Мутагенна активність гомогенату інвазійних ооцист *E. Maxima* у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	$\bar{X}$	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
Гомогенат інвазійних ооцист <i>E. maxima</i>	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	282±12,3	11,5	2
			спонтанний рівень ревертантів	24,6±2,2		
			1	58,3±4,1	2,4	1
			0,1	41±2,9	1,7	0
			0,01	32,3±3,1	1,3	0
	ТА-100	азид Na	1,5 мкг/чашку	586,3±10,5	10,9	2
			спонтанний рівень ревертантів	54±3,3		
			1	126,6±5,9	2,3	1
			0,1	82±3,6	1,5	0
			0,01	70,7±2,8	1,3	0

довища стерилізували в автоклаві за 0,5 атм. 30 хв (рівень рН після стерилізації — 7,0). Гомогенати готували зі зрілих ооцист еймерій, отриманих з посліду інвазованих курей після завершення споруляції, шляхом заморожування і подальшого подрібнення у водно-сольовому розчині за допомогою гомогенізатора Поттера (5000 об/хв за $t + 4^{\circ}\text{C}$) з тефлоновим товчачиком. Екстракти гомогенатів ооцист еймерій стерилізували крізь фільтр Зейтца. Дослідження проводили у трьох концентраціях — нативній, кратно зменшеній у 10 і 100 разів. Для контролю у дослідах з метаболічною активацією для штаму ТА-98 застосовували дауноміцин, який вводили у концентрації 6 мкг/чашку та для штаму ТА-100 азид Na, який вносився у кількості 1,5 мкг/чашку. Інкубацію проводили впродовж 48 годин.

Результати й обговорення

За визначення мутагенної активності гомогенату інвазійних ооцист *Eimeria maxima* (Табл. 1) нами встановлено, що за нативної концентрації на штаммах ТА-98 і ТА-100 у 100 % випадків зразки показали індукцію генних мутацій. Реверсія цих штамів була, відповідно, у 2,4 та 2,3 разу вища, ніж у контрольній групі. За розведення гомогенату інвазій-

них ооцист у 10 і 100 разів індукцію генних мутацій не виявлено.

Отримані дані вказують на те, що гомогенат інвазійних ооцист *E. maxima* містить біологічно активні речовини, які потенційно здатні індукувати зворотні генні мутації до гістидин-незалежності у штаммах *S. typhimurium* ТА-98 і ТА-100 за типом зміщення рамки зчитування та типом заміни пар основ, проте вони мають мутагенну активність слабкої сили (1 бал за шкалою мутагенності).

Визначаючи мутагенну активність гомогенату інвазійних ооцист *Eimeria tenella*, ми виявили (Табл. 2), що у всіх випадках зразки показали індукцію генних мутацій за нативної концентрації на штаммах ТА-98 у 2,4 та ТА-100 у 2,2 разу вищу, ніж у контрольній групі. За розведення гомогенату інвазійних ооцист у 10 і 100 разів індукцію генних мутацій не виявлено.

Отримані результати вказують на те, що у дослідах індукція не перевищувала 10 разів, що за загальноприйнятою шкалою мутагенності оцінюється в 1 бал.

За визначення мутагенної активності гомогенату інвазійних ооцист *Eimeria necatrix* (Табл. 3) реверсію за нативної концентрації виявлено на обох штаммах — ТА-98 та ТА-100. За цих умов перевищення кількості колоній у дослідах над контрольною групою

Таблиця 2

Мутагенна активність гомогенату інвазійних ооцист *E. tenella* у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	$\bar{X}$	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
Гомогенат інвазійних ооцист <i>E. tenella</i>	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	287±12,6	11,1	2
			спонтанний рівень ревертантів	25,7±2,5		
			1	61±4,4	2,4	1
			0,1	43±3,6	1,7	0
			0,01	32,7±2,9	1,3	0
	ТА-100	азид Na	1,5 мкг/чашку	591,7±10,3	10,8	2
			спонтанний рівень ревертантів	54,7±3,7		
			1	123±5,2	2,2	1
			0,1	82±3,1	1,5	0
			0,01	74±3,4	1,4	0

Таблиця 3

Мутагенна активність гомогенату інвазійних ооцист *E. necatrix* у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	$\bar{X}$	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
Гомогенат інвазійних ооцист <i>E. necatrix</i>	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	279,3±11,7	10,6	2
			спонтанний рівень ревертантів	26,3±2,8		
			1	62,3±4,2	2,4	1
			0,1	43±3,2	1,6	0
			0,01	33±2,1	1,3	0
	ТА-100	азид Na	1,5 мкг/чашку	588,3±10,9	11,1	2
			спонтанний рівень ревертантів	53±3,1		
			1	123,7±5,6	2,3	1
			0,1	81±3,4	1,5	0
			0,01	71,3±3,2	1,3	0

коливалось у межах одиниць 2,4 та 2,3 разу відповідно. За розведення гомогенату інвазійних ооцист у 10 і 100 разів індукцію генних мутацій не виявлено.

Отже, за вивчення мутагенної активності гомогенату інвазійних ооцист *E. necatrix* виявлена незначна індукція генних мутацій, яка стосувалася як зсуву рамки зчитування, так і заміни пар основ. Проте за шкалою мутагенності їх рівень оцінюється в 1 бал, що вказує на мутагенну активність слабкої сили.

За визначання мутагенної активності гомогенату інвазійних ооцист *Eimeria acervulina* індукція проявлялась у штаммах ТА-98 (у 2,5 разу) та ТА-100 (у 2,3 разу) за нативної концентрації (Табл. 4). За розведення гомогенату інвазійних ооцист у 10 і 100 разів індукцію генних мутацій не виявлено.

Отримані дані вказують на те, що гомогенат інвазійних ооцист *E. acervulina* містить біологічно активні речовини, які потенційно здатні індукувати зворотні генні мутації як

Таблиця 4

Мутагенна активність гомогенату інвазійних ооцист *E. acervulina* у тесті Еймса

Зразок	Тест-штам	Позитивний контроль	Розведення	$\bar{X}$	$\frac{X_d}{X_k}$	Мутагенність (бали)
Гомогенат інвазійних ооцист <i>E. acervulina</i>	ТА-98	дауноміцин	6 мкг/чашку	274,4±12,4	11,2	2
			спонтанний рівень ревертантів	24,3±2,2		
			1	59,6±4,3	2,5	1
			0,1	40±3,8	1,6	0
			0,01	31,6±2,1	1,3	0
	ТА-100	азид Na	1,5 мкг/чашку	585,2±10,6	11,2	2
			спонтанний рівень ревертантів	52,3±3,4		
			1	121,7±4,8	2,3	1
			0,1	80,9±2,4	1,5	0
			0,01	73,5±3,6	1,4	0

за типом зміщення рамки зчитування, так і за типом заміни пар основ. Вони мають слабку силу мутагенної активності (1 бал за шкалою мутагенності).

Висновки

Інвазійні ооцисти *Eimeria maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* та *E. acervulina* містять біологічно активні речовини з незначною мутагенною активністю (1 бал за шкалою мутагенності), які потенційно здатні індукувати зворотні генні мутації до гістидин-незалежності у штаммах *Salmonella typhimurium* TA-98 і TA-100 за типом зміщення рамки зчитування та типом заміни пар основ.

Перспективи подальших досліджень.

Дослідження показників мікроядерного тесту в еритроцитах периферичної крові курей за експериментального еймеріозу.

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, pp. 313–316.

2. Sobol Z. N., Styepanov A. V. Analysis of results of micronucleus test in auto breed mice spontananeously infested by *Lamblia muris*. *Bulletin of Vitebsk University*, 1998, vol. 10, № 4, pp. 58–61. (in Russian)

3. Styepanov A. V. Mutagenic influence of *Lamblia* and their metabolites. *Medical news*, 1999, № 3, pp. 61–62. (in Russian)

4. Styepanov A. V. Mutagenic influence of *Lamblia* on the somatic cells of host. *Bulletin of Belgorod State University*. 2000, ser. 2, № 3, pp. 54–56. (in Russian)

5. Manna G. K., Sarkar A. K. Mutagenic potential of human kala-azar hemoflagellate in mouse. *Current Science*. 1989, vol. 58, № 22, pp. 1268–1271.

6. Stybel V. V., Danko M. M. Research of the mutagenic and genotoxic potential of *Isospora suis* in the organism of piglets. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj*. 2011, vol. 13, № 4 (50), p. 1, p. 424–429. (in Ukrainian)

7. Pounikar R., Dawande A. Y. Detection of potential carcinogens by Ames test. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 2010, vol. 1, pp. 57–64.

8. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 2000, vol. 455, pp. 29–60.

9. Peek H. W. Resistance to anticoccidial drugs: alternative strategies to control coccidiosis in broilers. *Utrecht: Animal Health Service*, 2010. 244 p.

10. Tejs S. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, 2008, vol. 4 (1), pp. 7–14.