

Литература. 1. Веремей, Э. И. Распространение и профилактика заболеваний пальцев и копытцев у крупного рогатого скота / Э. И. Веремей, В. А. Журба // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2003. – № 2. – С. 33–35. 2. Веремей, Э. И. Лечение коров при гнойно-некротических процессах в области копытцев и пальцев / Э. И. Веремей, В. А. Журба, В. А. Лапина // Ветеринария. – 2004. – № 3. – С. 39–41. 3. Веремей, Э. И. Этиопатогенез и современные подходы к лечению гнойно-некротических процессов в области копытцев и пальцев у крупного рогатого скота / Э. И. Веремей, В. А. Журба, В. А. Лапина // Ветеринарный консультант. – № 16. – 2003. – С.10–11. 4. Иммунологический статус коров с гнойными ранами в дистальной части конечностей при использовании традиционного и комплексного лечения (СВ-2+ГО-2) / В. А. Журба, В. А. Лапина, Э. И. Веремей, В. М. Руколь // Ученые записки : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии», посвященной 80-летию основания УО ВГАВМ, 4-5 ноября 2004 года, г. Витебск / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2004. – Т. 40, ч. 1. – С. 61–62. 5. Прогнозирование ортопедических болезней у высокопродуктивного крупного рогатого скота / Э. И. Веремей, В. А. Журба, В. А. Лукьяновский, А. А. Стекольников, Б. С. Семенов // Современные проблемы ветеринарной хирургии : материалы Международной научно-практической конференции / Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины. – Санкт-Петербурге, 2004. – С. 10–12. 6. Профилактика заболеваний конечностей у крупного рогатого скота / В. М. Руколь, Э. И. Веремей, В. А. Журба, Н. А. Борисов // Инновационные подходы в ветеринарии, биологии и экологии : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию Уральской государственной академии ветеринарной медицины, 18 марта 2009 г. / Уральская государственная академия ветеринарной медицины. – Троицк, 2009. – С. 121–126. 7. Журба, В. А. Распространение и этиология дерматозов крупного рогатого скота / В. А. Журба // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2009. – Т. 45, вып. 2, ч.1. – С.21–23. 8. Журба, В. А. Изучение микробного состава гнойно-некротических ран в дистальном участке конечностей у крупного рогатого скота / В. А. Журба, А. А. Гласкович // Актуальные проблемы ветеринарной медицины : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 25-26 сентября 2003 г. / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2003. – Т. 2. – С. 188-200. 9. Журба В. А. Распространение гнойно-некротических поражений в дистальной части конечностей у крупного рогатого скота / В. А. Журба, А. В. Лабкович // Современные тенденции и перспективы развития животноводства : материалы XI Международной научной конференции студентов и магистрантов «Научный поиск молодежи XXI века», посвященной 170-летию Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – Горки, 2010. – С. 88–89. 10. Журба, В. А. Причины заболеваний дистального участка конечностей у высокопродуктивных коров / В. А. Журба, В. М. Руколь // Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы XII Международной научно-практической конференции / Гродненский государственный аграрный университет. – Гродно, 2009. – С. 435 - 436. 11. Лабкович, А. В. Клинический статус крупного рогатого скота с гнойными пододерматитами / А. В. Лабкович, В. А. Журба // Студенческая наука и инновационное развитие : материалы 95-й Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов «Студенты — науке и практике АПК», (Витебск, 20-21 мая 2010 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2010. – С. 27–28. 12. Лабкович, А. В. Гематологические показатели крупного рогатого скота с гнойными пододерматитами / А. В. Лабкович ; рук. работы В. А. Журба // Студенческая наука и инновационное развитие : материалы 95-й Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов «Студенты - науке и практике АПК» (Витебск, 20-21 мая 2010 года). – Витебск : ВГАВМ, 2010. – С. 28–29. 13. Влияние экзогенных факторов на состояние здоровья и продуктивность коров / Э. И. Веремей, М. Руколь, В. А. Журба, А. П. Волков, А. А. Стекольников, Б. С. Семенов / Актуальные проблемы ветеринарной хирургии : материалы Международной научной конференции / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2011. – С. 20–30.

Статья передана в печать 16.03.2016 г.

УДК 577.391:576.367

КОМЕТ-АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ ГОДОВИКОВ КАРПА, ИНВАЗИРОВАННЫХ ЭКТОПАРАЗИТАМИ *LERNAEA CYPRINACEA* И *DACTYLOGYRUS VASTATOR*

***Лобойко Ю.В., *Стибель В.В., **Данко Н.Н.**

*Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий им. С.З. Гжицкого, г. Львов, Украина

**Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, г. Львов, Украина

Исследованиями установлено, что при эктопаразитарных инвазиях *Lernaea cyprinacea* и *Dactylogyrus vastator* увеличивается степень фрагментации ДНК лимфоцитов крови, существенно снижается активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы в тканях гепатопанкреаса, скелетных мышц и жабр годовиков карпа.

*Research has established that parasitic infestation by *Lernaeia cyprinacea* and *Dactylogyrus vastator* increases the degree of DNA fragmentation of blood lymphocytes, significantly reduced the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in hepatopancreas tissues, skeletal muscles and gills of carp yearlings.*

Ключевые слова: карп, ДНК-комета, эктопаразиты, *Lernaeia cyprinacea*, *Dactylogyrus vastator*, антиоксидантные ферменты.

Keywords: carp, DNA-comet assay, ectoparasites, *Lernaeia cyprinacea*, *Dactylogyrus vastator*, antioxidant enzymes.

Введение. Одним из современных методов выявления первичных повреждений молекулы ДНК отдельных клеток под воздействием факторов окружающей среды считается гель-электрофорез единичных клеток - «Comet assay» или метод «ДНК-комета» [1].

После лизиса и электрофореза эукариотических клеток, которые проникли в агарозный слой, поврежденная ДНК мигрирует в электрическом поле по направлению к аноду и таким образом образует структуру, похожую на комету, в которой выделяется «голова» и «хвост». Интерпретация результатов основана на гипотезе, что вызванные генотоксическими факторами повреждения ДНК ядра состоят из низкомолекулярных участков, разрывов, репарационных-вырезанных повреждений и кислотно-лабильных участков ДНК [2].

Метод ДНК-комета позволяет выявлять повреждения на клеточном уровне, поэтому он нашел широкое применение в изучении влияния различных экстремальных факторов окружающей среды на организм животных [3, 4].

Целью нашей работы было исследование влияния интенсивности инвазии эктопаразитов на целостность ДНК лимфоцитов крови годовиков карпа, которую оценивали с помощью ДНК-комет анализа.

В процессе окисления энергетических субстратов аэробным путем в организме животных, в том числе у рыб, образуются активные формы кислорода (АФК), которые окисляют полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов мембран клеток, перекисным путем. Образующиеся продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) подвергают деструкции клеточные мембраны и биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты) [5, 6].

В результате эволюции в организме рыб сформировались специальные механизмы защиты от деструктивного действия продуктов ПОЛ, которые получили название антиоксидантной системы. Ее роль заключается в регуляции интенсивности образования АФК и обезвреживании продуктов ПОЛ. Как и у млекопитающих, система антиоксидантной защиты в организме рыб охватывает ферментное и неферментное звенья. К ферментному звену относятся ферменты супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы, каталазы [7, 8].

Данные об изменениях ферментного звена антиоксидантной системы при действии эктопаразитов в литературе отсутствуют. В связи с этим целью данной работы было исследование активности антиоксидантных ферментов в тканях карпа при инвазии эктопаразитами.

Материалы и методы исследований. С целью исследования степени повреждения ДНК лимфоцитов крови годовиков карпа при поражении эктопаразитами с разной степенью инвазии в аквариальных условиях был проведен опыт, в котором использовали спонтанно инвазированных возбудителями дактилогироза и лернеоза рыб.

Перед началом опыта были проведены паразитологические обследования рыб и определены показатели уровня их инвазированности. Для этого было сформировано двенадцать групп рыб по 6 особей в каждой, массой тела $38,0 \pm 4,8$ г. По четыре группы рыб (контрольная и три опытные) при моно- и смешанной инвазиях *L. cyprinacea* и *D. vastator*. Ихтиопаразитологический анализ проводили по методу неполного паразитологического вскрытия по И.Е. Быховской-Павловской [9]. Видовую принадлежность паразитов определяли по «Определителю паразитов пресноводных рыб фауны СССР» [10].

Интенсивность инвазии (ИИ) определяли путем подсчета количества паразитов на теле и жабрах исследуемой рыбы.

Рыбу содержали в аквариумах емкостью 40 дм³ с искусственной аэрацией при температуре 18-20 °С. Уход за рыбой и ее кормление проводили согласно соответствующим нормам и рационам. В течение всего периода исследований наблюдали за поведением и клиническим состоянием рыб.

Содержание, кормление, уход и все манипуляции с рыбами осуществляли согласно Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986 г.) и «Общих этических принципов экспериментов на животных», принятых Первым Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001). Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества [11].

Исследование фрагментации ДНК методом ДНК-комет проводили согласно Collins et al. [12]. Визуализацию результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа («Carl Zeiss», Германия). Кометы классифицировали с использованием стандартной таблицы соотношения размеров «головы» и «хвоста» ДНК-комет [13].

С целью определения активности антиоксидантных ферментов в тканях карпа при поражении эктопаразитами с разной степенью инвазии в аквариальных условиях был проведен опыт, в котором использовали спонтанно инвазированных возбудителями дактилогироза и лернеоза рыб. Исследовали образцы гепатопанкреаса, скелетных мышц и жабр, полученные от годовиков чешуйчатого карпа, пораженных лернеями и дактилогирозами, а также клинически здоровых.

Отобранные образцы тканей замораживали в жидком азоте и определяли в них активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы [14], глутатионпероксидазы [15] и каталазы [16].

Результаты исследований. При применении метода ДНК-комет в лимфоцитах крови контрольных рыб, инвазированных лернеями, в течение опыта показатель «момента хвоста» составил $0,46 \pm 0,12$ %, а процент апоптических клеток - $3,81 \pm 0,38$ (таблица 1). При инвазии *L. cyprinacea* до 0,08 экз./г массы тела в лимфоцитах крови экспериментальных рыб показатели «момента хвоста» и апоптических клеток не превышали контрольные.

Таблица 1 - Показатели «момента хвоста» и апоптических клеток лимфоцитов крови годовиков карпа, инвазированных *L. cyprinacea*, % ($M \pm m$, n=6)

Показатели	Группы рыб			
	1	2	3	4
	Контроль	до 0,08 экз. <i>L. cyprinacea</i> / г массы тела	0,11-0,26 экз. <i>L. cyprinacea</i> / г массы тела	> 0,26 экз. <i>L. cyprinacea</i> / г массы тела
Момент хвоста	$0,46 \pm 0,12$	$0,38 \pm 0,09$	$0,78 \pm 0,24$	$1,56 \pm 0,32^{**}$
Апоптические клетки	$3,81 \pm 0,38$	$4,06 \pm 0,75$	$4,56 \pm 0,67^*$	$4,68 \pm 0,65^{**}$

Примечания: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$.

При интенсивности инвазии 0,11-0,26 экз. / г массы тела показатель «момента хвоста» был в 1,7 раза выше показателя контрольной группы. Процент апоптических клеток превышал контрольный показатель в 1,2 раза ($P < 0,05$). При поражении > 0,26 экз. / г массы тела процент «момента хвоста» был в 3,4 раза выше, чем в контроле ($P < 0,01$). Количество апоптических клеток превышало в 1,2 раза данную величину в лимфоцитах крови контрольных рыб ($P < 0,01$).

При поражении рыб дактилогирозами вероятные колебания показателей «момента хвоста» и апоптических клеток в лимфоцитах крови рыб отмечали при интенсивности инвазии > 0,53 экз./ г.т. (таблица 2) в 2,6 ($P < 0,05$) и 1,3 раза ($P < 0,05$), соответственно.

Таблица 2 - Показатели «момента хвоста» и апоптических клеток лимфоцитов крови годовиков карпа, инвазированных *D. vastator*, % ($M \pm m$, n=6)

Показатели	Группы рыб			
	1	2	3	4
	Контроль	до 0,26 экз. <i>D. vastator</i> / г массы тела	0,29-0,53 экз. <i>D. vastator</i> / г массы тела	> 0,53 экз. <i>D. vastator</i> / г массы тела
Момент хвоста	$0,37 \pm 0,14$	$0,43 \pm 0,18$	$0,51 \pm 0,16$	$0,97 \pm 0,16^*$
Апоптические клетки	$3,54 \pm 0,36$	$3,76 \pm 0,42$	$3,84 \pm 0,48$	$4,76 \pm 0,28^*$

Примечание. * – $P < 0,05$.

При исследовании показателя «момента хвоста» в клетках лимфоцитов при смешанной инвазии был установлен достоверный его рост у рыб 2-й, 3-й и 4-й опытных групп, соответственно в 2,3 раза ($P < 0,05$), 4,3 ($P < 0,01$) и 4,8 раза ($P < 0,001$) (таблица 3). В то же время отмечали достоверное возрастание количества апоптических клеток в лимфоцитах крови рыб 3-й и 4-й опытных групп в 1,6 ($P < 0,05$) и 1,9 раза ($P < 0,01$).

Таким образом, было установлено возрастание степени фрагментации ДНК, что проявлялось в увеличении показателей «момента хвоста» и количества апоптических клеток лимфоцитов крови карпов, которые подвергались воздействию эктопаразитарной инвазии.

Проведенные нами исследования показали, что активность антиоксидантных ферментов в гепатопанкреасе и скелетных мышцах карпа значительно изменяется при поражении рыб лернеями. В частности, активность супероксиддисмутазы в гепатопанкреасе рыб 3-й и 4-й групп была значительно ниже, по сравнению с контрольной группой, в 1,5 и 2,2 раза, соответственно ($P < 0,001$). Тенденция к снижению наблюдалась и в тканях скелетных мышц. При инвазии лернеями (от 0,11 до 0,26 лерней на г массы тела и > 0,26 лерней на г массы тела) активность супероксиддисмутазы достоверно снижалась в 1,7 и 1,9 раза соответственно ($P < 0,001$).

Таблица 3 - Показатели «момента хвоста» и апоптических клеток лимфоцитов крови годовиков карпа при смешанной инвазии, % ($M \pm m$, n=6)

Показатели	Группы рыб			
	1	2	3	4
	Контроль	до 0,8 лерней / г массы тела; до 0,26 дактилогирозов / г массы тела	0,11-0,26 лерней / г массы тела; 0,29- 0,53 дактилогирозов / г массы тела	> 0,26 лерней / г массы тела; > 0,53 дактилогирозов / г массы тела
Момент хвоста	$0,41 \pm 0,17$	$0,94 \pm 0,14^*$	$1,76 \pm 0,32^{**}$	$1,98 \pm 0,27^{***}$
Апоптические клетки	$3,62 \pm 0,41$	$4,56 \pm 0,53$	$5,64 \pm 0,56^*$	$6,75 \pm 0,78^{**}$

Примечания: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

При исследовании активности глутатионпероксидазы установлено снижение ее активности в гепатопанкреасе рыб 4-й группы в 1,5 раза ($P<0,05$). У рыб 4-й группы, инвазированных лернеями, активность глутатионпероксидазы в скелетных мышцах была ниже в 1,6 раза ($P<0,001$).

Незначительный рост данного показателя наблюдали в жабрах карпов 4-й опытной группы ($P<0,05$). Полученные данные свидетельствуют об обратной зависимости между изменениями продуктов ПОЛ и активностью ключевых ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в гепатопанкреасе и скелетных мышцах рыб, инвазированных лернеями.

Проведенные нами исследования показали, что активность антиоксидантных ферментов в жабрах годовиков карпа значительно изменяется при инвазии рыб дактилогирусами. В частности, активность супероксиддисмутазы в жабрах рыб 3-й и 4-й групп была значительно ниже – в 1,6 ($P<0,01$) и 2,6 раза ($P<0,001$), по сравнению с контрольной группой.

Тенденцию к снижению активности наблюдали в тканях жабр при исследовании каталазы. При инвазии дактилогирусами (от 0,29 до 0,53 дактилогирусов на г массы тела и $>0,53$ дактилогирусов на г массы тела) активность каталазы достоверно снижалась в 1,7 ($P<0,01$) и 3,4 раза соответственно ($P<0,001$).

Исследованиями антиоксидантных ферментов при смешанной инвазии было установлено, что активность супероксиддисмутазы в гепатопанкреасе рыб 3-й и 4-й групп была значительно ниже, по сравнению с контрольной группой, – в 1,7 ($P<0,01$) и 2,3 раза ($P<0,001$) соответственно.

Тенденция к снижению наблюдалась в тканях скелетных мышц. В частности, у рыб 2-й, 3-й и 4-й опытных групп активность супероксиддисмутазы снижалась соответственно в 1,5 ($P<0,05$), 1,7 ($P<0,01$) и 2,6 раза ($P<0,001$). Активность супероксиддисмутазы в жабрах рыб 3-й и 4-й групп была значительно ниже, по сравнению с контрольной группой, соответственно в 1,8 ($P<0,01$) и 2,9 раза ($P<0,001$).

При исследовании глутатионпероксидазы установлено снижение ее активности в скелетных мышцах рыб 4-й группы в 1,4 раза ($P<0,05$). Исследованиями каталазы при смешанной инвазии было установлено, что ее активность в исследуемых тканях гепатопанкреаса годовиков карпа 3-й и 4-й опытных групп было достоверно ниже, чем в тканях здоровых рыб, в 1,9 ($P<0,05$) и 2,7 раза ($P<0,01$) соответственно, тогда как аналогичные отличия в активности каталазы в тканях скелетных мышц годовиков карпа 3-й и 4-й групп, по сравнению с рыбами контрольной группы, достоверно снижались соответственно в 3,3 ($P<0,05$) и 2,1 раза ($P<0,05$). Активность каталазы в тканях жабр годовиков карпа 3-й и 4-й групп, по сравнению с рыбами контрольной группы, достоверно снижалась, соответственно в 1,9 ($P<0,05$) и 3,2 раза ($P<0,01$).

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что при моно- и смешанной эктопаразитарных инвазиях *Lernaea cyprinacea* и *Dactylogyrus vastator* увеличивается степень фрагментации ДНК лимфоцитов крови, существенно снижается активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы в тканях гепатопанкреаса, скелетных мышц и жабр годовиков карпа.

Литература. 1. Cotellet, S. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology : A Review / S. Cotellet, J. F. Ferard // *Mutat. Res. Envir. and Mol. of Mutagen.* – 1999. – № 34. – P. 246–255. 2. Choucroun, P. Comet assay and early apoptosis / P. Choucroun [et al.] // *Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen.* – 2001. – № 478. – P. 89–96. 3. Oliva-Teles, A. Nutrition and health of aquaculture fish / A. Oliva-Teles // *J. Fish Diseases.* – 2012. – № 35 (2). – P. 83–108. 4. Онисковец, М. Я. Комет-анализ ступеня ушкодження ДНК лимфоцитів крові *Cyprinus carpio* L. за дії йонів свинцю / М. Я. Онисковец // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* – 2013. – Вип. 61. – С. 20–24. 5. Cadenas, E. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology* / E. Cadenas // ed. S. Ahmad. – London : Chapman & Hall, 1995. – P. 1 – 61. 6. Halliwell, B. // J. M. C. Gutteridge. – Oxford : Oxford University Press, 1999. – 968 p. 7. Martinez-Alvarez R.M., Morales A.E., Sanz A. // *Rev. Fish Biol. Fish.* – 2005. – V. 15. – № 1. – P. 75 – 88. 8. Storey K.B. // *Bras. J. Med. Biol. Res.* – 1996. – № 29. – P. 1715 – 1733. 9. Быховская – Павловская, Е. И. *Паразиты рыб. Руководство по изучению* / Е. И. Быховская – Павловская. – Ленинград : Наука, 1985. – 121 с. 10. *Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР* : В 3 т. / Под ред. О. Н. Бауэра. – Ленинград : Наука, 1987. – Т. 3 : *Паразитические многоклеточные.* – Ч. 2. – 584 с. 11. *Official Journal of the European Union L276/33. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.* – 86/609/EC. – 20.10.2010. 12. Collins A. R., Dobson V. L., Dusinska M. *The comet assay: what can it really tell us* *Mutation Research*, 1997, 375, pp. 183–193. 13. Rojas, E. *Single cell gel electrophoresis: methodology and applications* / E. Rojas, M. C. Lopez, M. Valverde // *J. Chromatography.* – 1999. – № 722 (1–2). – P. 225–254. 14. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. Я., Ефимова Л. Ф. // *Лаб. дело.* – 1983. – № 10. – С. 30 – 33. 15. Моин В. М. // *Лаб. дело.* – 1986. – № 12. С. 724 – 727. 5. В 3 т. / Под ред. А. Н. Бауэра. – Ленинград : Наука, 1987. – Т. 3 : *Паразитические многоклеточные.* – Ч. 2. – 584 с. 16. Королук М. А. Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16 – 18.

Статья передана в печать 20.02.2016 г.