

NEMATODŲ *TOXOCARA CANIS* AUDINIŲ POKYČIAI LEVAMIZOLIO POVEIKYJE *IN VIVO*

Rasa Aukštikalnienė¹, Antanas Vyšniauskas², Ona Kublickienė¹

¹Vilniaus universitetas, M. K. Čiurlionio 21/27, LT-2009, Vilnius, tel. 85-2133925,

el. pašto adr.: rasa.butautaitė@gf.vu.lt

²Lietuvos veterinarijos institutas, Helminologijos laboratorija, Mokslininkų 12, LT-2600, Vilnius, tel.: 729727

Santrauka. Šis darbas yra nematocidinių preparatų poveikio *T. canis* audiniams tyrimų serijos dalis. Šio eksperimento metu mes siekėme išaiškinti *T. canis* audinių struktūrinių ir funkcinių pokyčių dinamiką levamizolio poveikyje *in vivo*. Eksperimentiniai šuniukai, užsikrėtę *T. canis* nematodais, buvo dehelmintizuoti 7,5 mg/kg levamizoliu. *T. canis*, išsiskyre iš šeimininko žarnyno, praėjus 4, 10, 15, 25 ir 46 valandoms po to, kai buvo sušerta antihelminčio preparato, buvo ištirti histologiškai ir histochemiškai. Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad levamizolio poveikyje *T. canis* odos raumeniniame maiše ryški edema pasireiškė tik pirmuose eksperimento perioduose (4-tą, 10-tą ir 15-tą valandą). Žarnos epitelinėse ląstelėse pirmieji pokyčiai pasireiškė skaidulų susiliejimu jų citoplazmos apikaliniame poliuje. Vėlesniuose etapuose (25-tą ir 46-tą valandomis) šiose ląstelėse nustatėme vakuolėtumą bei bendrą pabrinkimą.

Glikogeno intarpai žarnos epitelinėse ląstelėse nuosekliai nyko 4, 10, 15 ir 25-tą eksperimento valandą. Tačiau eksperimento pabaigoje (46-tą valandą) PAS reakcija enterocituose vėl buvo teigiama. Hipodermoje, šoniniuose bei medialiniuose jos voleliuose ir raumeninėse ląstelėse glikogeno sankaupų bei jų išsidėstymo pokyčiai buvo neįžymūs.

Neutraliųjų lipidų intarpų *T. canis* odos raumeninio maišo audiniuose veikiant levamizoliu *in vivo* gausėjo nežymiai. Žarnos epitelinėje dangoje riebalinė distrofija pasireiškė jau pirmajame bandymo etape, o 46-tą valandą po dehelmintizavimo šių ląstelių citoplazma buvo užpildyta riebalų sankaupomis.

Apibendrinant *T. canis* audinių pokyčių levamizolio poveikyje *in vivo* tyrimų rezultatus, galima teigti, kad šis antihelminčikas prasiskverbia pro jų kutikulę į odos raumeninį maišą ir sukelia spazminį šių nematodų paralyžių, bei ryškius mikromorfologinius kutikulės, hipodermos ir raumeninių ląstelių pakitimus. Levamizolis stimuliuoja glikogeno sintezę *T. canis* hipodermoje ir raumeninėse ląstelėse anksčiau, nei šių nematodų žarnos bei lytinių latakų epitelinėse ląstelėse. Ryškūs neutraliųjų lipidų intarpai odos raumeniniame maiše bei enterocituose, visuose eksperimento etapuose, buvo levamizolio poveikyje *in vivo* sutrikusios riebalų šalinimo funkcijos išraiška.

Raktažodžiai: *Toxocara canis*, nematodų histologija, glikogenas, neutralieji lipidai, levamizolis.

HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES OF *TOXOCARA CANIS* NEMATODE UNDER THE ACTION OF LEVAMISOLE *IN VIVO*

Summary. The micromorphological and histochemical changes in the structures of *Toxocara canis* under the action of 7.5 mg/kg of levamisole *in vivo* were studied on the 4th, 10th, 15th, 25th and 46th hours post treatment. Six naturally infected puppies were treated with levamisole and the eliminated parasitic nematodes were collected for histological and histochemical studies.

According to our data, under the action of levamisole *in vivo* the distinct micromorphological alterations in *T. canis* body cover tissues were established only during the firsts periods of the investigation (at the 4th, 10th and 15th hour) (Fig. 1). They were expressed as distinct oedema of cuticle, hypodermis and muscle cells. The contractile parts of the muscle cells were especially thick nearby cuticle. They there blended together and formed entire layer beneath hypodermis. 25 and 46 hour onset the treatment the swelling of cuticle was slight. Hypodermis and its cords were swelled too, the toad vacuoles in the basal part of lateral cords disappeared. We established distinct vacuoles of various forms in the muscle cells, which fulfilled their cytoplasmic part at the 25th hour post-treatment. The muscle layer was separated from hypodermis in some regions.

The changes in the enterocytes of *T. canis* during the first period (the 4-10th hour) of experiment were expressed like blending of their fibrils in the apical cytoplasm of these cells. 25 hours onset the treatment their cytoplasm was lightly porous with various-shaped vacuoles. 46 hours onset the treatment we also established the vacuolization and slight swelling in this tissue.

The examination of PAS reaction in *T. canis* tissues under the action of levamisole showed that glycogen deposits' location and reaction remained unchanged in hypodermis, muscle cells and epithelial cells of sexual tubes during all periods of the experiment. A negative PAS reaction in the enterocytes were seen at the 25th hour post-treatment (Fig. 2). At the end of the experiment (the 46th hour) hypodermis, muscle cells and sexual tubes showed not only a positive PAS reaction, but also there were distinct deposits of glycogen in enterocytes (Fig. 3).

In examining the neutral lipids in *T. canis* tissues under the action of levamisole we have noticed that the accumulation of these compounds in hypodermis and muscle cells was slightly more intensive than in controls from the 10th hour to the end of the experiment (the 46th hour). We have noticed fat dystrophy in the enterocytes of *T. canis* during all periods of our examination (from the 4th to 46th hour) (Fig. 4). The lipid accumulation in the epithelial cells of sexual tubes, oocytes and eggs remained unchanged and was similar to that in controls.

Summarizing the alterations of *T. canis* tissues under the action of levamisole we can conclude that levamisole penetrates *T. canis* body cover tissues and causes spastic paralysis and degeneration processes first of all in cuticle, hypodermis and muscle cells.

Keywords: *Toxocara canis*, histology of nematodes, glycogen, neutral lipids, levamisole.

Įvadas. Greta parazitinių nematodų biologijos bei ekologijos klausimų nagrinėjimo, vienu iš svarbiausių šiuolaikinės parazitologijos uždavinių yra detalūs šių kirmėlių audinių mikromorfologiniai tyrimai. Helmintų audinių sandaros tyrimai yra svarbūs ne tik jų sistematikos bei filogenijos klausimų sprendimui, bet ir sudaro pagrindą tolimesniems fiziologiniams bei biocheminiams helmintų tyrimams. Taip pat yra būtini aiškinant helmintocidinių preparatų veikimo į parazitą mechanizmą.

Daugelio Nematoda klasės Ascaridida būrio nematodų audiniai yra gana nuodugniai ištirti. Didžiausias dėmesys, tiriant nematodų mikrostruktūrą, buvo skiriamas *Ascaris*, *Parascaris*, *Nippostrongylus*, *Trichuris*, *Trichinella* ir kitų genčių atstovams. Tuo tarpu *Toxocara* genties nematodai buvo mažiau tyrinėti (Bruňanská, 1993, 1994, 1997; Lewis and Maizels, 1993; Mackenstedt et al., 1993; Писарева, 1975; Рачковская, 1985).

Toxocara canis, dažni šunų žarnyno nematodai, yra pavojingi žmogaus ir kitų gyvūnų sveikatai. Daugelio autorių tyrimų duomenimis, šių parazitinių kirmėlių kiaušinėliais yra užkrėsti ne tik parkai bei skverai, bet ir vaikų žaidimo aikštelės (Lewis and Maizels, 1993; Prociw, 1989; Raether, 1988). Todėl, siekiant išvengti užsikrėtimo šiais nematodais, šunys turi būti reguliariai dehelmintizuojami. Šiuo požiūriu *T. canis* audinių mikroskopiniai tyrimai yra svarbūs ir taikomuoju aspektu, įvertinant vienų ar kitų nematocidinių preparatų veikimą į parazito organizmą bei atskirus jo audinius.

Šis darbas yra nematocidinių preparatų poveikio *T. canis* audiniams tyrimų serijos dalis. Šio eksperimento metu mes siekėme išaiškinti *T. canis* audinių struktūrinių ir funkcinę pokyčių dinamiką levamizolio poveikyje. Nors levamizolio naudojimas šunų ir kačių dehelmintizavimui yra ribojamas dėl galimo šalutinio poveikio gyvūnams ir įvairių kontraindikacijų, tačiau rekomenduojamomis dozėmis gyvūnų yra gerai toleruojamas (Raether, 1988). Medžiaga tyrimams surinkta sudėtingų eksperimentų *in vivo* metu.

Darbo tikslas - atlikti *T. canis* kutikulės, hipodermos, raumeninių ląstelių, žarnos bei lytinių latakų epitelinės dangos pokyčių dinamikos analizę levamizolio poveikyje *in vivo*. Histocheminiais metodais ištirti glikogeno ir neutraliųjų lipidų sankaupų pokyčius *T. canis* audiniuose veikiant minėtu antihelminktiku. Remiantis *T. canis* audinių mikromorfologinių ir histocheminių tyrimų rezultatais, išaiškinti galimus levamizolio patekimo būdus į šių nematodų audinius.

Tyrimo objektas ir metodai. Tirti *T. canis* nematodai, gauti iš natūraliai užsikrėtusių vieno mėnesio neveislinių šuniukų, paimtų iš Vilniaus benamių gyvūnų karantino stoties. Eksperimentui naudoti šeši šuniukai. Levamizoliu dehelmintizuoti penki, vienas šuniukas nedehelmintizuotas. Vienkartinė levamizolio dozė – 7,5

mg/kg – duota kiekvienam šuniukui atskirai. Davus antihelminktiko, keturias paras be pertraukos rinktos šuniukų išmatos. Iš jų buvo išrenkami visi *T. canis* nematodai. Pirmieji nematodai išsiskyrė praėjus 4 val., paskutiniai – 46 val. po to, kai sušerta levamizolio. Su išmatomis išsiskyrę gyvi (judantys arba labai susisukę) nematodai tuojau pat plauti fiziologiniu tirpalu ir fiksuoti histologiniams ir histocheminiams tyrimams. Eksperimento pabaigoje visi - dehelmintizuoti ir nedehelmintizuotas - šuniukai buvo numarinti ditilinu (miorelaktantu), suleidžiant jo į raumenis, bei išskrosti tam, kad būtų galima ištirti jų plonąjį žarnyną *T. canis* atžvilgiu. Nematodai, surinkti iš nedehelmintizuoto šuniuko plonosios žarnos, panaudoti *T. canis* audinių kontroliniams histologiniams ir histocheminiams tyrimams.

Iš viso surinkti 200 *T. canis* nematodų. Kad būtų galima įvertinti, kaip ilgainiui dėl levamizolio poveikio *in vivo* pakinta *T. canis* audiniai, histologiškai ir histochemiškai ištirta 150 nematodų, išsiskyrusių 4, 10, 15, 25 ir 46 valandą po to, kai šuniukams duota antihelminctinio preparato.

Formalinu fiksuoti *T. canis* gabaliukai 24 val. plauti tekančiu vandeniu, dehidratuoti vis didesnės koncentracijos spiritu, skaidrinti ksilolu ir užlieti parafinu, vadovaujantis įprastomis histologinėmis metodikomis. Mikromorfologiniams *T. canis* audinių tyrimams helmintai supjaustyti 10 μm storio pjūviais, kurie klijuoti ant objektinių stiklelių, deparafinuoti ir standartiškai dažyti hematoksilinu–eozinu.

Glikogeno sankaupoms *T. canis* audiniuose nustatyti nematodų gabaliukai 12 val. fiksuoti Karnua mišiniu. Po to jie perkelti į 70° spiritą. Vėliau *T. canis* gabaliukai dehidratuoti vis didesnės koncentracijos spiritu, skaidrinti ksilolu ir užlieti parafinu, vadovaujantis įprastomis metodikomis. 10 μm storio helmintų pjūviai klijuoti ant objektinių stiklelių ir deparafinuoti. Glikogenas *T. canis* audiniuose išryškintas PAS (Šifo reagento ir perjodo rūgšties) reakcija, atliekama pagal Šabadašą. PAS reakcijos kontrolei *T. canis* audiniuose naudota seilių amilazė.

Neutraliesiems lipidams *T. canis* audiniuose išryškinti 10 % neutraliu formalinu fiksuoti *T. canis* gabaliukai 24 val. plauti tekančiu vandeniu ir pjaustyti šaldomuoju mikrotomu. Audinių pjūviai merkti į distiliuotą vandenį tiesiai ant objektinių stiklelių, džiovinti ir dažyti sudano III–IV mišiniu.

Rezultatai. Pirmiausia ištirta *T. canis*, surinktų iš nedehelmintizuoto šuniuko, histologinė ir histocheminė struktūra. *T. canis* audinių mikromorfologinių tyrimų rezultatai parodė, kad šių helmintų audinių mikrostruktūros principai yra bendri ir kitiems Ascaridida būrio nematodams tik būdingi kai kurie rūšiniai skirtumai.

Visuose *T. canis* audiniuose, išskyrus kutikulę, nustatyta teigiama PAS reakcija ir tankiai išsidėstę glikogeno intarpai. Tiriant neutralių lipidų išsidėstymą *T. canis* audiniuose, nustatyta, kad lipidų tarpų juose yra nedaug. Šių nematodų hipodermoje, raumeninėse, žarnos ir lytinių latakų epitelinėse ląstelėse neutralieji lipidai buvo išsidėstę difuziškai ir dažėsi silpnai. Tik oocituose ir kiaušinėliuose riebalinių tarpų buvo gausu ir jie dažėsi intensyviai. Riebalinių tarpų *T. canis* kutikulėje nenustatėme.

Palyginus mūsų atliktų glikogeno ir neutralių lipidų išsidėstymo *T. canis* audiniuose tyrimų rezultatus su kitų autorių (Bruňanská, 1993, 1994, 1997; Писарева, 1975; Рачковская, 1985) tyrimų duomenimis, paaiškėjo, kad *T. canis* audiniuose šie intarpai išsidėstę ir dažosi taip pat, kaip ir kitų rūšių nematodų, pavyzdžiui, *Ascaris suum*, audiniuose.

Šiame eksperimente *T. canis* nematodų eliminacija iš šuniukų žarnyno prasidėjo praėjus keturioms valandoms po jų dehelmintizavimo levamizoliu. Šių nematodų kutikulėje buvo matyti ryškūs pokyčiai. Jie pasireiškė bendru kutikulės pabrėkimu, bei gausiomis vakuolėmis pamatiniame sluoksnyje (1 pav.). 10-tą ir 15-tą valandą išsiskyrusių nematodų kutikulės žievinis sluoksnis buvo raukšlėtas, kiek ryškesnis už kitus. Šie pokyčiai pasireiškė ir 25-tą eksperimento valandą.

Hipoderma ir jos struktūros 4-tą eksperimento valandą buvo ženkliai pabrėžę, citoplazmoje buvo gausu bazofiliškų granulių. 10-15-tą bandymo valandą šoniniuose hipodermos voleliuose esančios pamatinės vakuolės buvo susitraukusios, vietomis visai neišryškėjo. Praėjus 25-ioms valandoms po preparato sudavimo hipodermos ir volelių citoplazmoje buvo matomos gausios, smulkios vakuolės.

Raumeninių ląstelių susitraukiančiosios dalys, esančios prie hipodermos, 4-tą eksperimento valandą buvo pabrėžusios, susiliejusios tarpusavyje ir sudarė ištisinį sluoksnį (1 pav.). Tarpląsteliniuose raumeninių ląstelių tarpuose buvo matyti eozinofiliškas, tinkliškai išsidėstęs eksudatas. Šių ląstelių citoplazminė dalis buvo drumsta, su gausiais grūdėliais, citoplazmos dribsniais bei smulkiosiomis vakuolėmis. 10-15-tą bandymo valandą raumeninių ląstelių branduolio "krepšelio" struktūros neišryškėjo ir jis buvo panašus į vientisą, tamsią masę. 25-tą eksperimento valandą raumeninių ląstelių sluoksnis daugelyje vietų buvo atsiskyręs nuo hipodermos. Raumeninių ląstelių citoplazma buvo užpildyta gausiomis vakuolėmis.

Žarnos epitelinės ląstelės 4-tą eksperimento valandą buvo pakitusios nežymiai. Enterocitų citoplazmoje buvo gausu bazofiliškų grūdelių, skaidulos susiliejusios o apikalinio poliaus citoplazma hematoksilinu-eozinu dažėsi tamsiau nei kontrolėje. Panašius pokyčius enterocituose nustatėme ir 10-15-tą eksperimento valandą. Ryškų žarnos epitelinės dangos ląstelių pabrėkimą nustatėme 25-tą eksperimento valandą. Citoplazma buvo ženkliai išretėjusi, joje matėsi pavienės vakuolės ir

bazofiliški grūdėliai. Sutankėjusios epitelinių ląstelių citoplazmos skaidulos apikaliniam ląstelių poliuije sudarė santykinai storą, eozinofilišką sluoksnį.

Lytinių latakų epitelinėje dangoje pakitimus nustatėme 46-tą bandymo valandą. Jie pasireiškė gimdos epitelinių ląstelių pabrėkimu ir raukšlėmis jų paviršiuje.

Paskutiniame eksperimento etape (46-tą valandą) pokyčiai *T. canis* audiniuose pasireiškė tik silpnais ar ryškesniais jų pabrėkimais.

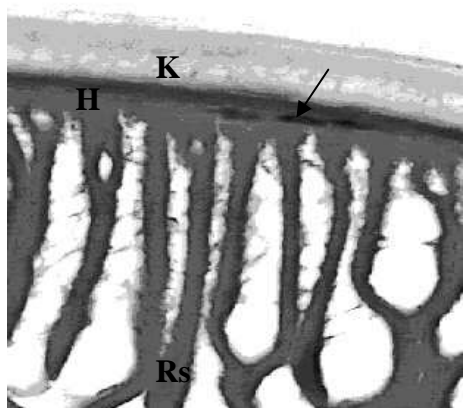
Taigi, levamizolio poveikyje *T. canis* odos raumeniniame maiše ryški edema matoma tik pirmuose eksperimento perioduose (4-tą, 10-tą ir 15-tą valandą). Žarnos epitelinėse ląstelėse pirmieji pokyčiai pasireiškė skaidulų susiliejimu jų citoplazmos apikaliniam poliuije. Vėlesniuose etapuose (25-tą ir 46-tą valandomis) šiose ląstelėse nustatėme vakuolėtumą bei bendrą pabrėkimą.

Histocheminiai glikogeno sankaupų ir jų išsidėstymo *T. canis* audiniuose tyrimai parodė, kad levamizolis, praėjus 4, 10 ir 15-ai valandų po jo sudavimo šuniukams, šių nematodų hipodermoje, jos voleliuose ir raumeninėse ląstelėse nesukėlė matomų PAS reakcijos pokyčių. PAS reakcija šiuose audiniuose buvo teigiama ir intensyvi, kaip kontrolėje. 25-tą valandą odos raumeninio maišo audiniuose glikogeno reakcija buvo šiek tiek silpnesnė nei kontrolėje. Tačiau eksperimento pabaigoje (46-tą valandą) *T. canis* hipodermoje, jos voleliuose bei raumeninėse ląstelėse PAS reakcija vėl buvo ryškiai teigiama ir prilygo kontrolei.

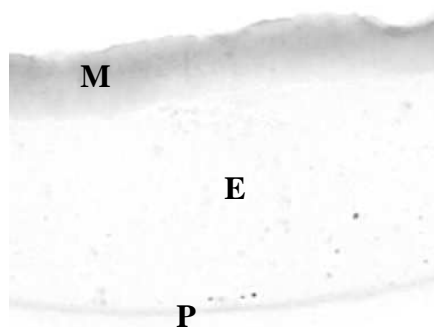
Žarnos epitelinėse ląstelėse 4-10-tą bandymo valandą neigiama PAS reakcija buvo matyti enterocitų apikaliniam poliuije. Centrinėje šių ląstelių dalyje ir pamatinio poliaus citoplazmoje glikogenas buvo išsidėstęs pavienių dribsnių pavidalu. Visišką glikogeno sankaupų išnykimą enterocitų citoplazmoje nustatėme 25-tą eksperimento valandą (2 pav.). Tačiau kai kurių, šiame tyrimo periode eliminuotų nematodų žarnos epitelinėse ląstelėse buvo matyti blyškiai nusidažę glikogeno likučiai. Teigiama PAS reakcija enterocituose vėl buvo nustatyta eksperimento pabaigoje (46-tą valandą) (3 pav.). Ryškūs glikogeno intarpai buvo tankiai išsidėstę žarnos epitelinėse ląstelėse, išskyrus apikalinio poliaus citoplazmą, kur teigiama PAS reakcija buvo tik retuose glikogeno grūdeliuose.

T. canis lytinių latakų epitelyje, šio antihelmintiko poveikyje, PAS reakcijos intensyvumas kito nežymiai. Silpną PAS reakciją 15-tą bandymo valandą nustatėme kiaušidėse. Tačiau, eksperimento pabaigoje *T. canis* lytinių latakų epitelinėje dangoje PAS reakcija vėl buvo teigiama.

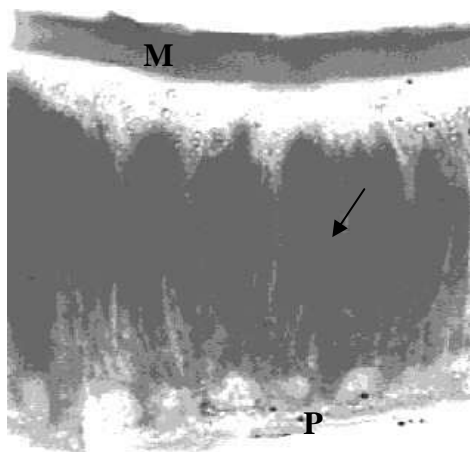
Taigi, kaip matyti iš mūsų tyrimų rezultatų, levamizolio poveikyje žarnos epitelinėse ląstelėse glikogeno intarpai nuosekliai nyko 4, 10, 15 ir 25-tą eksperimento valandą. Tačiau eksperimento pabaigoje (46-tą valandą) PAS reakcija enterocituose vėl buvo teigiama. Hipodermoje, šoniniuose bei medialiniuose jos voleliuose ir raumeninėse ląstelėse glikogeno sankaupų bei jų išsidėstymo pokyčiai buvo nežymūs.



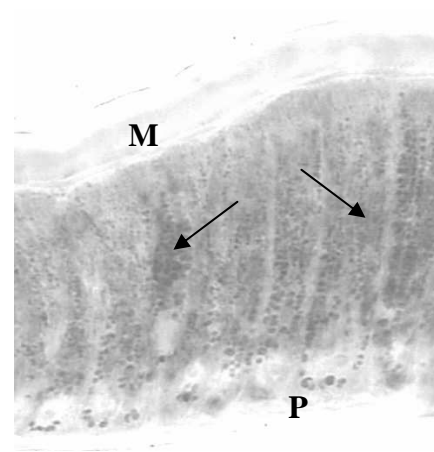
1 pav. *T. canis* odos raumeninis maišas 4-tą valandą po levamizolio sudavimo: K – kutikulė, Rs – raumeninių ląstelių susitraukiančiosios dalys, H – hipoderma, rodyklė – hipodermos branduoliai. Hematoksilinas-eozinas; padidinimas 10×40



2 pav. Neigiama PAS reakcija *T. canis* žarnoje 25-tą valandą po levamizolio sudavimo: M – mikrogaureliai, P – pamatinė membrana, E – enterocitai. Padidinimas 10×40



3 pav. Teigiama PAS reakcija *T. canis* žarnoje 46-tą valandą po levamizolio sudavimo: M – mikrogaureliai, P – pamatinė membrana, rodyklė – gausūs glikogeno intarpai. Padidinimas 10×40



4 pav. *T. canis* žarna 46-tą valandą po levamizolio sudavimo: M – mikrogaureliai, P – pamatinė membrana, rodyklės – riebaliniai intarpai enterocitų citoplazmoje. Sudanas III-IV; padidinimas 10×40

Histocheminiai neutraliųjų lipidų intarpų tyrimai parodė, kad 4-tą tyrimo valandą eliminuotų nematodų hipodermoje, jos šoniniuose bei medialiniuose voleliuose ir raumeninėse ląstelėse riebalinių intarpų išsidėstymas nepakito. Šiuose audiniuose neutralieji lipidai buvo išsidėstę kaip kontrolėje. 10-tą eksperimento valandą raumeninių ląstelių tarpląstelinuose tarpuose bei citoplazminėje jų dalyje riebaliniai intarpai ryškių lašelių pavidale buvo išsidėstę pavieniui ar grupėmis. Panaši neutraliųjų lipidų reakcija odos raumeninio maišo audiniuose buvo nustatyta ir vėlesniuose tyrimo etapuose (10, 15 ir 25-tą valandą) bei eksperimento pabaigoje (46-tą valandą).

Enterocitų citoplazmoje gausūs riebaliniai intarpai buvo matyti jau eksperimento pradžioje (4-tą valandą). Visuose tolimesniuose eksperimento etapuose riebalinė distrofija pasireiškė gausiais įvairaus dydžio riebalų lašeliais, kurie užpildė šių ląstelių citoplazmą. Reikia pažymėti, kad praėjus 10, 15 ir 25-ioms valandoms po levamizolio sudavimo stambūs riebalinių intarpų lašeliai buvo susikaupę centrinėje ląstelių dalyje, ypač tankiai aplink branduolius. Tuo tarpu apikalinėje ląstelių

citoplazmos dalyje dominavo smulkūs šių intarpų lašeliai. Jie buvo pasiskirstę difuziškai. Eksperimento paskutinis etapas (46-tą valandą po preparato sudavimo) pasižymėjo intensyvia riebaline infiltracija enterocitų citoplazmoje: neutraliųjų lipidų lašeliai vietomis buvo susilieję ir sudarė vientisas įvairios formos riebalų sankaupas (4 pav.).

T. canis lytinių latakų epitelinėse ląstelėse neutralieji lipidai buvo dulkielių pavidalo visuose levamizolio poveikio tyrimo etapuose. Jie dažėsi silpnai, kaip ir kontrolėje. Šių nematodų oocituose, esančiuose kiaušidėse, bei kiaušinėliuose, esančiuose gimdoje, riebalai dažėsi taip pat intensyviai, kaip ir kontrolėje.

Kaip matyti iš mūsų tyrimų rezultatų, *T. canis* odos raumeninio maišo audiniuose veikiant levamizoliu *in vivo* neutraliųjų lipidų intarpų gausėjo nežymiai. *T. canis* žarnos epitelinėje dangoje riebalinė distrofija pasireiškė jau pirmajame bandymo etape, o 46-tą valandą po dehelmintizavimo šių ląstelių citoplazma buvo užpildyta riebalų sankaupomis.

Rezultatų apibendrinimas. Duomenų apie levamizolio poveikį parazitinių kirmėlių audiniams literatūroje yra labai nedaug ir jie nėra išsamūs. Taip pat,

nėra literatūrinių duomenų apie šio anihelminčio poveikį glikogeno ir neutraliųjų lipidų sankaupoms ir jų išsidėstymui *T. canis* audiniuose. Todėl šioje bandymų serijoje mes siekėme išaiškinti *T. canis* audinių pokyčius levamizolio poveikyje *in vivo*.

H. Verhoeven ir kt. (Verhoeven et al., 1975) nustatė, kad *Ascaris suum* odos raumeniniame maiše levamizolio ir jo derivatų kiekis (apskaičiuotas kūno masės vienetai), po helmintų inkubacijos levamizolio terpėje, buvo žymiai didesnis negu pseudocelominiame skystyje, virškinimo ar lytinėje sistemoje. Tai rodo, kad didžioji levamizolio dalis patenka į askaridžių organizmą pro jų kūno dangos audinius (Verhoeven et al., 1975). Daugelio autorių teigimu (Atchinson et al., 1991; Boczoń, 1996; Harrow and Gration, 1985; van den Bossche, 1976), levamizolis sukelia parazitinių kirmėlių raumenų paralyžių, kuris, priklausomai nuo antihelminčio koncentracijos, gali būti grįžtamas (Boczoń, 1996; Roy et al., 1981). Atsižvelgę į tai, manome, kad mūsų eksperimente *T. canis*, levamizolio poveikyje, nebepajėgė pasipriešinti šeimininko žarnų peristaltikai ir gana anksti (4-tą bandymo valandą) buvo eliminuoti iš šuniukų organizmo.

Pirmomis mūsų eksperimento valandomis (4-tą bei 10-tą) eliminuotų *T. canis* odos raumeniniame maiše jau buvo matyti kai kurie pokyčiai. Kutikulės ir hipodermos sluoksniai buvo ženkliai pabrinkę, o tarpląstelinuose raumeninių ląstelių tarpuose buvo matyti susikaupęs eksudatas. Tuo tarpu *T. canis* žarnos epitelinės ląstelės pirmame bandymo etape buvo pakitusios nežymiai: pasireiškė pabrinkimas ir skaidulų susilieėjimas ląstelių citoplazmoje. Sprendžiant iš šių pokyčių galime teigti, kad levamizolis prasiskverbė pro *T. canis* kutikulę ir pirmiausia ryškiau pažeidė kutikulės-hipodermos-raumenų sistemos audinius. Ženklesnių *T. canis* kutikulės pakitimų vėlesniuose eksperimento etapuose (15, 25 ir 46-tą valandą) nenustatėme. Tirdama *Toxocara mystax* tetramizolio (levamizolio pirmtako) poveikyje *in vivo*, I. Račkovskaja (Рачковская, 1985) nustatė panašius jų kutikulės pakitimus pirmomis eksperimento valandomis. Autorė taip pat nurodė *T. mystax* raumeninių ląstelių miofibrilų bei citoplazmos pakitimus.

Yra žinoma (Borgers et al., 1975), kad nematocidinių junginių absorbcija nematodų žarnos epitelinėse ląstelėse sukelia lizosominių fermentų išsiliejimą jų citoplazmoje, ko pasekoje įvyksta ląstelių struktūrų suirimas. Atsiradus žarnos epitelinėse ląstelių pažaidoms, antihelminčiai gali pasyviai patekti į ląstelių citoplazmą ir sukelti papildomus jų pažeidimus (Sood and Kaur, 1982). Matomai dėl šios priežasties, ženklėsius *T. canis* žarnos epitelinėse ląstelių pakitimus mes nustatėme tik praėjus 25-ioms valandoms po levamizolio sudavimo eksperimentiniams šuniukams. Enterocitų pokyčiai pasireiškė ne tik jų pabrinkimu, bet ir citoplazmos išretėjimu, pavienių vakuolių atsiradimu bei sąlyginai storu eozinofilišku sluoksniu jų apikaliniuose poliuose. Ryškius *T. mystax* enterocitų pokyčius tetramizolio poveikyje I. Račkovskaja (Рачковская, 1985) taip pat nustatė tik antroje eksperimento pusėje. T. Roy ir kt. (Roy et al., 1981) maksimalią levamizolio koncentraciją *Ascaridia galli* odos raumeninio maišo audiniuose nustatė

praėjus dviems valandoms, o žarnos epitelinėse ląstelėse - praėjus keturioms valandoms nuo eksperimento pradžios. Tuo tarpu M. Sood ir R. Kaur (Sood and Kaur, 1982) duomenimis, *Haemonchus contortus* žarnos epitelinės dangos mikromorfologinės ir fermentinės deformacijos, kai kurių antihelminčių (tame tarpe ir tetramizolio) poveikyje *in vitro*, buvo žymiai ryškesnės, nei jų odos raumeniniame maiše. Šie autoriai (Sood and Kaur, 1982) teigia, kad tokį poveikio skirtumą atskiriems audiniams sąlygoja ne tik nematodų rūšies jautrumas tiriamam preparatui, bet ir antihelminčio cheminė prigimtis.

T. canis lytinės sistemos audiniuose ryškesnių pakitimų levamizolio poveikyje *in vivo* mes nenustatėme. Šių nematodų lytinių latakų išbrinkimas ir gimdos epitelinės dangos raukšlės pasireiškė tik eksperimento pabaigoje (46-tą valandą). Subrendę, padengti apvaskalais, ir dar besiformuojantys, nesubrendę kiaušinėliai nebuvo pakitę. B. Sanderson (Sanderson, 1970) teigimu, imidazotiazoliams, kuriems priklauso ir levamizolis, yra būdingas nežymus ovocidinis aktyvumas. *T. mystax* lytinėje sistemoje tetramizolio poveikyje *in vivo* I. Račkovskaja (Рачковская, 1985) nustatė oocitų dangalų susilieėjimą, jų citoplazmos grūdėtumą ir vakuoles, o taip pat subrendusių kiaušinėlių deformaciją.

Analizuodami PAS reakcijos pokyčius *T. canis* audiniuose levamizolio įtakoje, pastebėjome, kad kai kuriuose audiniuose jie buvo palyginti silpnai išreikšti. Tyrimo metu nustatėme, kad šių nematodų odos raumeniniame maiše ir kiaušinėliuose PAS reakcija visuose bandymo etapuose nepakito. *T. canis* enterocituose glikogeno intarpų išnykimą nustatėme 25-tą eksperimento valandą. Tik silpnai teigiama PAS reakcija šiame tyrimo etape buvo matyti ir kiaušidėse.

P. Komuniecki ir R. Saz (Komuniecki and Saz, 1982) nustatė, kad po paralyzuojančio levamizolio poveikio, *Litomosoides carinii* audiniuose kinta angliavandenių metabolizmas. Daugelis autorių (Donahue et al., 1983; Komuniecki and Saz, 1982; Roy et al., 1981; Sood and Kaur, 1982; Verhoeven et al., 1975) įrodė, kad levamizolio poveikyje nematodų audiniuose sumažėja glikogeno fosforilazės aktyvumas. C. Behm ir Ch. Bryant (Behm and Bryant, 1985) teigimu, pasikeitus fermentų aktyvumui nematodų *Nematospiroides dubius* bei *Trichostrongylus colubriformis* audiniuose suaktyvėja glikogeno sintezė, o tai ir pakeičia kirmėlių energijos apykaitą. Gliukozės metabolizmas sulėtėja ir pradedamos kaupti glikogeno atsargos.

Mūsų eksperimente teigiamą PAS reakciją *T. canis* odos-raumeniniame maiše galima paaiškinti tuo, kad levamizolis pirmiausia prasiskverbia pro nematodų kutikulę ir stimuliuoja glikogeno sintezę odos raumeniniame maiše (Verhoeven et al., 1975). Kaip nurodo H. Verhoeven ir kt. (Verhoeven et al., 1975), *A. suum* nematodų perkėlimas iš žymėto levamizolio terpės į neutralią, įtakoja levamizolio pasišalinimą iš jų odos raumeninio maišo į terpę. Mūsų nuomone, levamizolis iš *T. canis* odos raumeninio maišo audinių galėjo patekti ir į šių nematodų kūno ertmę. Tokiu būdu *T. canis* žarnos ir lytinių latakų epitelines ląsteles galėjo pasiekti nauja levamizolio ar jo metabolitų dozė, nes šeimininko žarnose

šio preparato koncentracija gana greitai sumažėja (Behm and Bryant, 1985). Tai patvirtina vėl teigiama PAS reakcija žarnos ir lytinių latakų epitelinėse ląstelėse 46-tą eksperimento valandą.

Tirdami neutraliųjų lipidų pokyčius *T. canis* audiniuose levamizolio poveikyje *in vivo* mes nustatėme, kad šių junginių sankaupos hipodermoje, raumenyse bei enterocituose buvo ryškesnės, nei kontrolėje. Ypač ryškia riebalinę distrofiją nustatėme *T. canis* žarnos epitelinėse ląstelėse visuose levamizolio poveikio tyrimo etapuose. Ši distrofija pasireiškė gausiais neutraliųjų lipidų tarpais šių ląstelių citoplazmoje. Lytinės sistemos audiniuose riebalinių tarpų reakcija mažai kito ir buvo kaip kontrolėje. Tuo tarpu I. Račkovskaja (Рачковская, 1985) nurodo, kad *T. mystax* odos raumeninio maišo audiniuose tetramizolio poveikyje *in vivo* riebalų sankaupos ir išsidėstymas nesiskyrė nuo kontrolės, o žarnos ir gimdos epitelinėse ląstelėse bei oocituose riebalinių tarpų žymiai sumažėjo.

Kaip yra žinoma, nematodų audiniuose neutralieji lipidai yra glikogeno apykaitos produktai (Barrett, 1983). Nors 46-tą eksperimento valandą *T. canis* audiniuose buvo teigiama PAS reakcija (gausios glikogeno atsargos), riebaliniai tarpai juose taip pat buvo ryškūs. Tai gali reikšti, kad *T. canis* audiniuose, šio antihelminτικο įtakoje, sutriko angliavandenių apykaitos produktų (neutraliųjų lipidų) šalinimo funkcija.

Apibendrinant šiuos *T. canis* audinių pokyčių levamizolio poveikyje *in vivo* tyrimų rezultatus ir literatūrinius duomenis, galima teigti, kad šis antihelminτικός prasiskverbia pro jų kutikulę į odos raumeninį maišą ir sukelia spazminį šių nematodų paralyžių, bei ryškius mikromorfologinius kutikulės, hipodermos ir raumeninių ląstelių pakitimus. Taip pat, sprendžiant iš PAS reakcijos pokyčių, levamizolis stimuliuoja glikogeno sintezę *T. canis* hipodermoje ir raumeninėse ląstelėse anksčiau, nei šių nematodų žarnos bei lytinių latakų epitelinėse ląstelėse. Ryškūs neutraliųjų lipidų tarpai odos raumeniniame maiše bei enterocituose, visuose eksperimento etapuose, buvo levamizolio poveikyje *in vivo* sutrikusios riebalų šalinimo funkcijos išraiška.

Išvados. 1. *T. canis* odos raumeninio maišo audiniuose levamizolio poveikyje edemą nustatėme jau pirmomis eksperimento valandomis. PAS reakcija buvo teigiama, o riebalinė infiltracija ryški visuose bandymo etapuose

2. *T. canis* enterocitų degeneracijos požymiai nustatyti tik 25-tą eksperimento valandą. Glikogeno atsargos išnyko 25-tą valandą, o 46-tą valandą enterocituose PAS reakcija vėl buvo teigiama. Riebalinė distrofija šiame audinyje buvo ryški visuose eksperimento etapuose.

3. *T. canis* lytinių latakų epitelį levamizolis pažeidė silpniausiai. PAS reakcija šiame audinyje kito nežymiai, o neutraliųjų lipidų pokyčių jame nenustatėme.

anthelmintics on rat and gastrointestinal nematode somatic muscle // *Tox. And Applied Pharmacol.* 1991. N. 112. P. 133-143.

2. Barrett J. Lipid metabolism // *Biology of eucestoda*. 1983. N. 2. P. 391-419.

3. Behm C.A., Bryant Ch. The mode of action of some modern anthelmintics. *In: Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs / Ed. N. Anderson and P.J. Waller. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia, 1985. P. 57-67.*

4. Boczoń K. System nerwowy helmintów jako pole działania leków przeciworobaczych // *Wiadomości Parazitologiczne*. 1996. N. 42(4). P. 373-379.

5. Borgers M., De Nollin S., De Brabander M., Thienpont D. Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells // *Am. J. Vet. Res.* 1975. N. 36. P. 1153-1166.

6. Bruňanská M.. *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae): the fine structure of the oogonia and oocytes // *Helminthologia*. 1993. N. 30. P. 9-13.

7. Bruňanská M. *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae): ultrastructure of the rachis and the ovarian wall // *Folia Parasitologica*. 1994. N. 41P. 149-153.

8. Bruňanská M. *Toxocara canis* (Nematoda: Ascarididae): the fine structure of the oviduct, oviduct-uterine junction and uterus // *Folia Parasitologica*. 1997. N. 44. P. 55-61.

9. Donahue M. J., Yacoub N. J., Harris B. G. Correlation of muscle activity with glycogen metabolism in muscle of *Ascaris suum* // *The American Physiological Society*. 1983. N. 25. P. 515-521.

10. Harrow I.D., Gratton K.F. Mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole on the muscle cell membrane of the nematode *Ascaris suum* // *Pestic. Sci.* 1985. N. 16. P. 662-672.

11. Komuniecki P.R., Saz H.J. The effect of levamisole on glycogen syntase and the metabolism of *Litomosoides carinii* // *J. Parasitol.* 1982. N. 68(2). P. 221-227.

12. Lewis J. W. and Maizels R. M. *Toxocara* and Toxocarosis // *Institute of Biology, London*. 1993. 182 p.

13. Mackenstedt U., Smidt S., Mehlhorn H., Stoye M., Traeder W. Effects of pyrantel pamoate on adult and preadult *Toxocara canis* worms: an microscope and autoradiography study // *Parasitology Research*. 1993. N. 79. P. 567-578.

14. Prociw P. *Toxocara pteropodis* and visceral larva migrans // *Parasitology Today*. 1989. N. 5 (4). P. 106-109.

15. Raether W. Chemotherapy and other control measures of parasitic diseases in domestic animals and man. *In: Parasitology in Focus / Ed. E. Mehlhorn. Springer, Berlin, Heidelberg, New York*. 1988. P. 739 - 852.

16. Roy T.K., Srivastata V.M.L., Mohand Rao V.K. Nonspecific binding of levamisole with proteins of the cuticle-hypodermis-muscle system of adult female *Ascaridia galli* // *Indian J. of Experimental Biology*. 1981. N. 19. P. 379-385.

17. Sanderson B.E. The effects of anthelmintics on nematode metabolism // *Comp. Gen. Pharmac.* 1970. N. 1. P. 125-151.

18. Sood M.L., Kaur R. The *in vitro* effects of some drugs on the morphology and histochemistry of adult *Haemonchus concortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) // *Helminthologia*. 1982. N. 19. P. 61-70.

19. Van den Bossche H. The molecular basis of anthelmintic action. *In: Biochemistry of parasites and host-parasite relationships / Ed. H. Van den Bossche. North Holland, Amsterdam*. 1976. 553-572.

20. Verhoeven H.L.E., Willemsens G., Van den Bossche H. Uptake and distribution of levamisole in *Ascaris suum*. *In: Biochemistry of parasites and host-parasite relationships / Ed. H. Van den Bossche. North Holland, Amsterdam*. 1975. 573-579.

21. Писарева Т.А. Микроморфологическое и гистохимическое исследование тканей нематоды *Toxocara mystax* (Zeder, 1800; Stiles, 1907) в норме и при воздействии некоторых антигельминтиков // *Автореф. канд. дисс. Баку*. 1975.

22. Рачковская И.В. Тонкая структура нематод и тканей хозяина при воздействии антигельминтиков // *Автореф. докт. дисс. Москва*. 1985.

Literatūra

1. Atchinson W.D., Geary T.G., Mannig B.et al. Comparative neuromuscular blocking action of levamisole and pyrantel-type

2002 06 13