

УДК 619.616.995.132(57.085.23)

**ЦИТОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА *BAYLISASCARIS TRANSFUGA* RUDOLPHI, 1819 (ASCARIDOIDEA, NEMATODA) НА КУЛЬТУРУ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫС**

Иванов В. А., аспирант

Сивкова Т. Н., доктор биологических наук, доцент

E-mail: tatiana-sivkova@yandex.ru

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

«Пермский государственный аграрно-технологический университет  
имени академика Д. Н. Прянишникова» Пермь, Россия

Аннотация. Бейлисаскариоз – широко распространенное нематодозное заболевание медведей, для которого в последнее время установлена возможность инвазии других животных, а также человека с явлением мигрирующей личинки, в связи с чем целью данного эксперимента стало установление влияния соматического экстракта половозрелых *Baylisascaris transfuga* на культуру фибробластов крыс. Через 36 часов эксперимента установлено цитопатическое и кариопатическое действие, проявляющееся в снижении митотической активности культуры, уменьшения размера фибробластов, кариопикноза и деформации ядра, сопровождающиеся высвобождением свободного фосфора.

Ключевые слова: фибробласты, экстракт, *Baylisascaris transfuga*, культура, патология

**CYTOPATIC EFFECT OF *BAYLISASCARIS TRANSFUGA* RUDOLPHI, 1819 (ASCARIDOIDEA, NEMATODA) ON RAT FIBROBLAST CULTURE**

Ivanov V. A., postgraduate student

Sivkova T. N., doctor of biological sciences, associate professor

E-mail: tatiana-sivkova@yandex.ru

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education

«Perm State Agro-Technological University  
named after academician D. N. Prianishnikov», Perm, Russia

Annotation. Baylisascariasis is a widespread nematode disease of bears, for which the possibility of invasion of other animals, as well as humans, with the phenomenon of migratory larvae has been established. Therefore the purpose of this experiment is to establish the effect of the somatic extract of adult *Baylisascaris transfuga* on the rat fibroblasts culture. After 36 hours of the experiment, the cytopathic and karyopathic effect has been established. It has manifested in a decrease in the mitotic activity of the culture, a decrease in the size of fibroblasts,



karyopyknosis and nuclear deformation, accompanied by the release of free phosphorus.

Keywords: fibroblasts, extract solution, *Baylisascaris transfuga*, culture, pathology

Введение. Среди паразитарных болезней бурого медведя наиболее распространенным является бейлисаскариоз, встречающийся в различных странах мира [12, 13], в России [4] и на территории Пермского края [2]. Недавними исследованиями доказано, что *B. transfuga* у неспецифичных хозяев, к которым может относиться и человек, провоцирует развитие синдрома мигрирующей личинки *larva migrans* [8, 12]. При экспериментальном заражении лабораторных мышей отмечена их высокая смертность с преимущественным поражением печени и поражением глаз, сердца, почек, селезенки, легких, мозга, скелетных мышц и тощей кишки [10].

Указанный синдром *larva migrans* отмечен также для личинок другой нематоды – *Anisakis simplex*, провоцирующей как воспаление, так и развитие гранулем в организме человека и животных. Помимо этого, в эксперименте на лабораторных мышах доказано цитопатическое и кариопатическое действие антигена-экстракта из личинок анизакид [5], с которым связано его потенциальное онкогенное действие. Онкогенный эффект в настоящее время доказан для описторхисов, шистосом, токсокар, диروفиллярий [1, 3, 6, 7]. Однако эксперименты на лабораторных животных сопровождаются цепью ответных реакций со стороны иммунной системы, тогда как непосредственное патогенное действие на клетки можно оценить исключительно с применением в качестве моделей клеточных культур, что и послужило целью нашей работы.

Материалы и методы. Соматический экстракт готовили по методу Rutenberg E.J. et al., 1976 в нашей модификации из свежих половозрелых *Baylisascaris transfuga*, Rudolphi, 1819, полученных в ходе неполного гельминтологического вскрытия трупа спонтанно инвазированного бурого



медведя (*Ursus arctos*, Linnaeus, 1758), добытого охотниками в Добрянском районе Пермского края. Экстрагирование проводили в фосфатно-солевом буферном растворе рН 7,2-7,4 в условиях холодильной камеры при 4-6°C в течение 48 часов. В приготовленном биоматериале определяли содержание белка при помощи набора реагентов «Белок-ПГК-Ново (вариант 1)» (Вектор-Бест, Россия) на биохимическом анализаторе Awareness Technology StatFax 1904+ (США) колориметрическим методом с пирогаллоловым красным. Контроль биоматериала на стерильность выполняли посевом на стандартные питательные среды МПА и Сабуро с экспозицией, соответственно 48 часов и 7 дней.

Материалом для исследования служил монослой фибробластов крысы на среде  $\alpha$ -MEM с добавлением 1 % сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. В среду с фибробластами инъецировали раствор экстракта *B. transfuga* (ЭБ) в количестве 2,0 (№ 1) и 1,0 (№ 2) мл. Контроль оставался интактным на протяжении всего периода наблюдений. Контрольные и экспериментальные культуры помещали в термостат и культивировали при температуре +37°C с визуальным контролем каждые 12 часов. Через 36 часов от начала эксперимента жидкость удаляли и определяли следующие показатели: общий белок, глюкозу (Вектор-Бест), калий (Витал), кальций (Вектор-Бест), магний (Вектор-Бест), фосфор (Вектор-Бест). Определение кислотности проводили с применением индикаторных полосок «Биосенсор АН» (Россия).

Фибробласты для микроскопического анализа фиксировали этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимзе, после чего просматривали на микроскопе «Meiji» (Japan) при увеличении  $\times 40$ ,  $\times 100$  и  $\times 400$ . Отмечали состояние клеток, а также наличие митозов и патологий.

Результаты и обсуждение. Полученный из половозрелых нематод *B. transfuga* экстракт был стерильным, содержание белка в нем составило 2,0 г/л. После внесения ЭБ визуальных изменений в контрольных и экспериментальных пробах в течение 24 часов не отмечали, монослой выглядел



однородным. Спустя 36 часов в экспериментальных образцах было отмечено незначительное изменение цвета среды (появление рубинового оттенка), а также разрежение монослоя, в связи с чем было решено остановить культивирование и провести цитологические и биохимические исследования.

Различия кислотности рН, а также биохимических показателей относительно содержания белка и глюкозы в культуральной жидкости экспериментальных и контрольных проб не отметили, однако были зафиксированы отклонения в количестве электролитов (таблица 1). Так, в пробе № 1 с более высокой концентрацией ЭБ по сравнению с контролем несколько снизилось содержание кальция и магния, тогда как содержание фосфора возросло практически наполовину. Указанные изменения не могут быть связаны с химическим составом самого экстракта из аскаридных нематод, поскольку он изначально содержит более высокие концентрации всех электролитов, а также белка и глюкозы [9, 10]. По нашему мнению, увеличение количества свободного фосфора может быть связано с разрушением нуклеотидов при повреждении ядерного аппарата.

Таблица 1 – Биохимический состав питательных сред с добавлением ЭБ по сравнению с контролем

Проба	рН	Белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л	Калий, ммоль/л	Кальций, ммоль/л	Магний, ммоль/л	Фосфор, ммоль/л
№ 1	7,02	16,4	5,2	8,76	1,72	0,53	2,19
№ 2	7,05	16,1	5,9	7,71	1,93	0,62	1,10
Контроль	7,06	16,3	5,2	8,85	1,97	0,68	1,23

Морфология фибробластов по сравнению с контролем (рисунок 1) в результате эксперимента также изменилась. Плотность клеток в монослое уменьшилась, среди них появился значительный полиморфизм, причем большое количество клеток уменьшилось в размерах, отмечен кариопикноз и зернистость цитоплазмы, свидетельствующие о дегенеративных изменениях.



Помимо этого, часть фибробластов из экспериментальных культур демонстрировала формирование патологии ядра в виде его фрагментации (рисунок 2), позволяющем констатировать кариопатический эффект изучаемого экстракта.

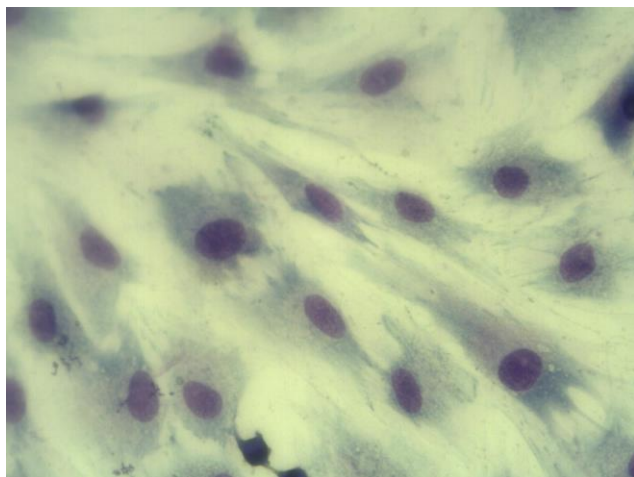


Рисунок 1 – Фибробласты крысы.

Контроль. Романовский-Гимза.

Увел. ×400

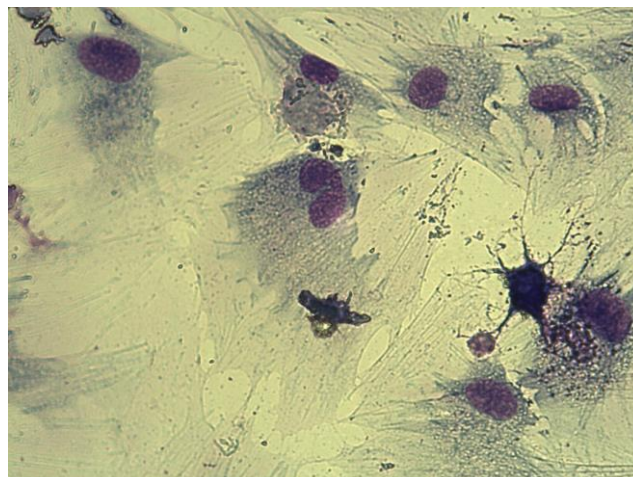


Рисунок 2 – Фибробласты после

введения ЭБ. Патология ядра.

Романовский-Гимза. Увел. ×400

Заключение. В эксперименте на культуре фибробластов крыс, культивируемых в течение 36 часов совместно с экстрактом из половозрелых *B. transfuga*, установлено цитопатическое и кариопатическое действие, проявляющееся в снижении митотической активности культуры, уменьшения размера клеток, кариопикноза и деформации ядра.

#### Список источников

1. Антипролиферативное действие экстракта из половозрелых *Toxocara canis* на моделях опухолевых клеток человека *in vitro* / В. К. Бережко, Т. С. Новик, Е. И. Ковешникова, Т. И. Данилова и [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2018. № 1. С. 32-36.



2. Зименков В.А., Доронин-Доргелинский Е. А., Сивкова Т. Н. Кишечные паразиты бурого медведя в Пермском крае // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2016. № 17. С. 191-193.
3. Инфекционная кариопатология / И. Н. Ильинских, В. В. Новицкий, Е. Н. Ильинских [и др.] ; под ред. Н. Н. Ильинских. Томск : Изд-во Том. ун-та. 2005. 168 с.
4. Паразитологическое обследование медведей на северо-востоке Горного Алтая и на Среднем Сихотэ-Алине / О. А. Панова, А. В. Хрусталева, О. П. Курносова [и др.] // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2018. № 19. С. 374-377.
5. Сивкова Т. Н., Бережко В. К. Кариопатическое и патоморфологическое действие продуктов метаболизма личинок анизакид : монография. Пермь : Пермская ГСХА. 2011. 132 с.
6. Согрина А. В., Бережко В.К., Написанова Л. А. Патологии мейоза клеток семенников белых мышей под воздействием соматического антигена *Dirofilaria immitis* // Естественные и математические науки в современном мире : сборник статей по материалам XXVII международной научно-практической конференции. Новосибирск : СибАК. 2015. № 2 (26). С.176-184.
7. Neglected Agent Eminent Disease: Linking Human Helminthic Infection, Inflammation, and Malignancy / N. Arora, R. Kaur, F. Anjum et al. // Front Cell Infect Microbiol. 2019. № 9 (402). – P. 402-416.
8. Bugmyrin S. V., Spiridonov S. E. First record on the infestation of small rodents by *Baylisascaris transfuga* (Ascaridoidea: Nematoda) in natural habitats / // Russian Journal of Nematology. 2019. Vol. 27, № 2S. P. 146.
9. Isoenzymatic pattern of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Ascaris suum* / C. Cutillas, B. Rodriguez, P. German, D. Guevara. doi:10.1017/S0022149X0001316X // Journal of Helminthology. 1993. № 67 (3). P. 226-232.



10. Enigk K., Feder H., Dey-Hazra A. Zur chemischen Zusammensetzung von *Ascaris suum* (Nematoda) nach unterschiedlicher Mineralstofffütterung der Wirtstiere [The chemical composition of *Ascaris suum* (Nematoda) after feeding of various mineral substances to the host animals (author's transl)] // Z Parasitenkd. 1973. № 42 (2). P. 147-64.
11. *Baylisascaris transfuga* (Ascaridoidea, Nematoda) from European brown bear (*Ursus arctos*) causing larva migrans in laboratory mice with clinical manifestation / J. Juránková, L. Hofmannová, L. Frgelecová, et al. // Parasitol Res. 2022. P. 645-651.
12. *Baylisascaris transfuga*: a parasite with zoonotic potential / M. M. Sheikh, H. Tak, M. F. Fazili, B. A. Bhat, I. N. Wani // International Journal of Advanced Scientific Resesarch and Management. 2018. V. 3, Iss. 12. P. 174-180.
13. A frequent roundworm *Baylisascaris transfuga* in overpopulated brown bears (*Ursus arctos*) in Slovakia: a problem worthy of attention. / G. Štrkolcová, M. Goldová, V. Šnábel, M. Špakulová, T. Orosová, M. Halán, J.Mojžišová // Acta Parasitol. 2018. № 63. P. 167-174.

