**АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКСТРАКТА
ANISAKIS SIMPLEX RUDOLPHI, 1809 (DUJARDIN, 1845) L3
НА КЛЕТКИ ЛИНИИ VERO *IN VITRO***

Сивкова Т. Н.¹,

доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры инфекционных болезней, tatiana-sivkova@yandex.ru

Сивкова Е. С.¹,

katsivkova59@gmail.com

Аннотация

Изучено влияние стерильного цельного соматического экстракта из замороженных личинок третьего возраста нематоды *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809 (Dujardin, 1845) на перевиваемую культуру клеток млекопитающих. Впервые в качестве модели использовали клеточную линию фибробластов Vero (африканская зеленая мартышка, почка), изготовленную ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, Россия, на питательной среде ИглаМЕМ. В условиях *in vitro* доказано выраженное антипролиферативное действие соматического экстракта из анизакид, ведущее к полной деструкции монослоя клеток-фибробластов через 48 часов культивирования. Полученные нами результаты можно расценивать как проявление четкого ингибирующего эффекта изучаемого экстракта на пролиферацию культуры Vero, что представляет значительный интерес в области клеточной технологии и паразитологии и может являться основой для последующих экспериментов по изучению патогенеза и профилактики анизакидоза у человека и животных.

Ключевые слова: *Anisakis simplex*, фибробласты, гибель.

¹ ФГБОУ ВО Пермский аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 23)

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF *ANISAKIS SIMPLEX* RUDOLPHI, 1809 (DUJARDIN, 1845) L3 EXTRACT ON VERO LINE CELLS *IN VITRO*

Sivkova T. N.¹,

Doctor of Biological Sciences, Associate Professor,
Professor of Infection Diseases Department
sivkovaei@mail.ru

Sivkova E. S.¹,

katsivkova59@gmail.com

Abstract

The effect of a sterile crude extract from the frozen *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809 (Dujardin, 1845) third stage larvae on the transplantable culture of mammalian cells is described. At the first time fibroblasts cells line Vero (from African green monkey, kidney) obtained from the «BioloT», St Petersburg, Russia, on a nutrient media EMEM were used. In the in vitro conditions a significant antiproliferative action of crude somatic extract expressed by complete destruction of the monolayer of fibroblast-like cells after 48 hours of cultivation is proven. Therefore, our results can be regard as a manifestation of a pronounced inhibitory effect of the studied extract on the proliferation of Vero culture, which is of considerable interest in the field of cell technology and Parasitology and may be use as the basis for subsequent experiments to study the pathogenesis and prevention of anisakiasis in humans and animals.

Keywords: *Anisakis simplex*, fibroblasts, destruction.

Введение. Проведенными ранее исследованиями доказано, что цельный соматический экстракт из личинок третьей стадии нематод *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809 (Dujardin, 1845) даже после длительного глубокого замораживания сохраняет в своем составе белки, которые способны негативно воздействовать на клетки эукариот и прокариот. Ранее подобные исследования проводили на примере лабораторных животных (крыс и мышей), куриных эмбрионов, инфузорий, а также некоторых микроорганизмов-прокариот. В то же время установлено, что объектами для изучения цитопатического и антимиотического действия белков и метаболитов гельминтов могут служить перевиваемые клеточные культуры. Так было выявлено антипролиферативное влияние белкового экстракта из половозрелых токсокар (*Toxocara canis* Werner, 1782) на культуры опухолевых клеток молочной железы (MCF-7) и ободочной кишки (Caco-2) человека [1].

¹ Perm State Agro-Technological University (23, Petropavlovskaya st., Perm, 614990, Russia)

В связи с этим целью нашей работы стало изучение воздействия соматического экстракта из личинок *A. simplex* L3 на перевиваемую культуру в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали монослой фибробласто-подобных клеток линии Vero (африканская зеленая мартышка, почка), культивируемых на питательной среде ИглаМЕМ с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки, свободной от контаминации бактериями, грибами и микоплазмами, изготовленной ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, Россия.

Экстракт из личинок анизакид готовили стандартным методом, устанавливали его стерильность и безвредность. Концентрацию белка в материале определяли на биохимическом полуавтоматическом анализаторе StatFax 1904+ (AWARENESS technology inc.) с набором реактивов Spinreact, S.A. при длине волны 540 нм согласно инструкции. Полученный экстракт хранили при температуре -18°C, непосредственно перед работой экстракт размораживали до достижения комнатной температуры и использовали без разведения.

В флаконы с культурой клеток вносили по 1 мл экстракта, контрольные пробы оставались интактными на протяжении всего эксперимента. Флаконы помещали в стерильный термостат с установленной температурой +37°C. Учет результатов проводили через 24 и 48 часов с использованием инвертированного микроскопа Olympus CK (Japan).

Результаты исследований. Визуальный контроль течения эксперимента через 24 часа позволил установить наличие нормальной пролиферации клеток культуры Vero, однако спустя 48 часов, в отличие от контроля, под воздействием экстракта из личинок анизакид мы регистрировали полную деструкцию фибробластов, в связи с чем изучить морфологические изменения в клетках, подвергнутых эксперименту, не представилось возможным.

Полученные нами результаты можно расценивать как проявление выраженного ингибирующего эффекта изучаемого экстракта на пролиферацию перевиваемой культуры фибробластов. Подобную активность в отношении отдельных клеток эукариот отмечали и ранее. Так, в эксперименте на инфузориях *Paramecium caudatum* (Ehrenberg, 1838) установлено выраженное токсическое действие, проявляющееся нарушениями структуры наружных мембран на полюсах простейших и образованием в них пор [2], что подтверждает непосредственное цитопатическое действие на клетку, не связанное с иммунным или

аллергическим действием гельминтов, а обусловленное, вероятнее всего, развитием метаболических нарушений.

Заключение. Установленное антипролиферативное действие соматического экстракта *A. simplex* L3 в условиях *in vitro* представляет значительный интерес в области клеточной технологии и паразитологии и может являться основой для последующих экспериментов по изучению патогенеза и профилактики анизакидоза у человека и животных.

Литература

1. Бережко В.К., Новик Т.С., Ковешникова Е.И., Данилова Т.И., Написанова Л.А., Чукина С.И., Камышников О.Ю., Успенский А.В., Руднева О.В. Антипролиферативное действие экстракта из половозрелых *Toxocara canis* на моделях опухолевых клеток человека *in vitro* // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2018. № 1. С. 32–36.
2. Лазарева О.И., Сивкова Т.Н., Чугунова Е.О. Токсическое действие соматического экстракта личинок *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) Dujardin, 1845 на одноклеточные микроорганизмы *Paramecium caudatum* (Ehrenberg, 1838) // Сб. мат. VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии». Севастополь: Изд-ль Бондаренко Н.Ю., 2016. С. 94–95.

References

1. Berezhko V.K., Novik T.S., Koveshnikova E.I., Danilova T.I., Napisanova L.A., Chukina S.I., Kamyshkinov O.Yu., Uspensky A.V., Rudneva O.V. Antiproliferative effect of extract from *Toxocara canis* adults on human tumor cell models *in vitro*. *Medical parasitology and parasitic diseases*. 2018; (1):32–36. (In Russ.)
2. Lazareva O.I., Sivkova T.N., Chugunova E.O. Toxic effects of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) larvae somatic extract on microorganisms *Paramecium caudatum* (Ehrenberg, 1838). In: *Contemporary problems of theoretical and marine parasitology: collection of scientific papers* / Eds.: K.V. Galaktionov, A.V. Gaevskaya. Sevastopol: Bondarenko Publishing, 2016. P. 94–95. (In Russ.)