

С.В. Ялышева¹, Б.О. Бекманов¹, Н.Н. Ахметсадыков²¹Казахский Национальный университет им. аль-Фараби²ТОО НПП «Антиген»**ВЫРАЩИВАНИЕ ПРОТОСКОЛЕКСОВ ДО СТАДИИ СЕГМЕНТАЦИИ В УСЛОВИЯХ INVITRO**

В статье приводится описание методики выращивания протосколексов *in vitro* до стадии пресегаментации. Изучение этапов развития паразита представляет важное значение для изучения особенностей данного паразита в условиях *in vitro*. В ходе данной работы представлены результаты по выращиванию протосколексов в течение 20 дней, что соответствует стадии PS 3. Для исследования применяли материал, собранный со скотопоен, расположенных в Алматинской области. При подготовке среды использовали методику, воспроизводящую среду тонкого отдела кишечника собак. В качестве активатора роста протосколексов была использована желчь собаки. Результаты проделанной работы свидетельствуют о перспективности исследований цестод в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: *Echinococcus granulosus*, эхинококкоз, протосколекс, *in vitro*, культивирование паразитов

Введение: Эхинококкоз (*Echinococcus granulosus*) - инвазионная болезнь плотоядных, сельскохозяйственных животных и человека. Окончательными хозяевами являются домашние и дикие плотоядные - собаки, волки, шакалы и др., в тонком отделе кишечника которых паразитирует половозрелая форма гельминта *Echinococcus granulosus*. На сегодняшний день Республика Казахстан входит в число стран неблагополучных по эхинококкозу. Наиболее высокая частота встречаемости отмечается в Джамбульской, Алматинской, Южно-Казахстанской, Западно-Казахстанской области. В этих регионах зараженность животных достигает 20,4-47,13%, а показатели заболеваемости людей эхинококкозом (5,13-7,61 на 100 тысяч населения) превышают в несколько раз средние показатели, полученные в целом по республике [1]. Выращивание личиночных форм *in vitro* позволяет исследовать эхинококкоз минуя угрозу заражения для персонала [2]. До настоящего момента в Казахстане не проводилось работ по выращиванию *E. granulosus in vitro*.

Целью исследования явилось изучение выращивания протосколексов в условиях *in vitro* с получением особей пре-сегментарной стадии развития с описанием морфологии последних.

Материалы и методы: В работе использованы 15 эхинококковых цист, изолированных из печени и легких овец и крупного рогатого скота на территории Алматинской области. После отбора, зараженные органы помещались в боксы для транспортировки. Сбор протосколексов проводили в стерильных условиях по стандартной методике [3]. Собранную гидатидную жидкость отстаивали в 50 мл Falcon пробирках. Жизнеспособность определяли с помощью микроскопии (x400) по наличию двигательной активности. Для культивирования использовались цисты, в которых более 80% протосколексов были подвижны.

Культивирование осуществляли на базе лаборатории паразитологии ТОО НПП «Антиген». Приготовление среды для выращивания протосколексов проводили по методике, описанной Smythetal. [4,5]. Среда для культивирования двухфазная - состояла из жидкой фазы (260 мл RPMI, 100 мл эмбриональная телячья сыворотка, 36 мл 5% экстракта дрожжей (в RPMI), 5,6 мл 30% глюкозы (в дистиллированной воде), 1,4 мл 5% собачьей желчи (в PBS), 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, 10 мМ NaHCO₃) и твердой фазы (сыворотка КРС, коагулированная на водяной бане при 76 °С в течение 20-30 минут). Параллельно с таурохолатом натрия, который описан в оригинальной методике, для индукции развития протосколексов была использована собачья желчь, предварительно отфильтрованная (Millex-GV Filter, 0.22 µm). Культивирование проводилось во флаконах Falcon™ Tissue Culture Treated Flask, 50 мл. Инкубация осуществлялась при 37°С и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Смена среды проводилась каждые 4-8 дней [6].

Результаты: В процессе работы удалось добиться роста протосколексов до 3 стадии роста (Ps.3).

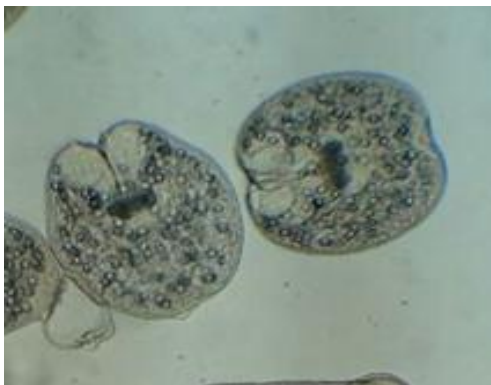


Рисунок 1 - Недифференцированные протосколексы после выделения из цисты

На рисунке 1 показаны протосколексы после выделения из цисты, видны присоски и крючья над ними.



Рисунок 2 – Эвагинированный протосколекс

На рисунке 2 показан протосколекс спустя 24 часа после начала культивирования. Его тело удлиняется и содержит множество известковых телец. Для данной стадии характерна большая подвижность паразита, что связано с необходимостью закрепиться в стенке кишечника окончательного хозяина.



Рисунок 3 – Эвагинированный протосколекс с зачатками формирования выделительного канала

На рисунке 3 показан протосколекс спустя 8 дней после начала культивирования. Для данной стадии характерно начало формирования экскреторного канала. Активность паразита постепенно снижается.



Рисунок 4 – Эвагинированный протосколекс с экскреторным каналом и секреторным пузырьком

На рисунке 4 показан протосколекс спустя 11 дней после начала культивирования. Характеризуется исчезновением известковых телец, латеральные экскреторные каналы хорошо визуализируются, присутствует генитальный рудимент, указывающий на формирование первой проглоттиды. Сужение ниже шейки обозначает место формирования сегмента. Развитие стадий протосколексов протекало неравномерно, в то время как одни достигли третьей стадии некоторые из протосколексов были только на первой. Не наблюдалось существенных различий при использовании таурохолата натрия и собачей желчи, при повторном выращивании была использована только собачья желчь. Процент выживших протосколексов, доросших до стадии составил 50%.

Обсуждение результатов: В процессе исследования удалось вырастить протосколексов до 3 стадии. Использование собачьей желчи, содержащей соли таурохолата, позволяет обойтись без использования дорогих коммерческих реагентов, кроме того

следует учитывать ее доступность. Однако желчные кислоты содержат дезоксихолат натрия способный разрушать неодермис — синцитиальный эпителий, приводя тем самым к гибели протосколексов. Тем не менее в естественных условиях развитие последних происходит именно в таких условиях.

Выводы: Выращенные паразиты не продуцируют плодородных или зрелых яиц, соответственно нет никакого риска заражения для исследователей. Вышеописанный способ выращивания *E. granulosus* в культуральных средах может открыть новые возможности для исследования и работы над эхинококкозом, в частности, диагностики, способов защиты и лечения этого опасного паразитарного заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Рекомендации «Мероприятия по профилактике и девакации эхинококкоза в Республике Казахстан». - Алматы, 2015. - 26 с.
- 2 Mohammadzadeh T. et al. Establishment of a modified in vitro cultivation of protoscoleces to adult *Echinococcus granulosus*; an important way for new investigations on hydatidosis // Iranian journal of parasitology. - 2012. - Т.7. - №1. - С. 59-64.
- 3 Smyth J. D. Studies on tapeworm physiology: XI. In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscoleces to the strobilate stage // Parasitology. - 1967. - Т. 57., №1. - С. 111-133.
- 4 Smyth J. D., Davies Z. In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results // International Journal for Parasitology. - 1974. - Т.4., №6. - С. 631-644.
- 5 Smyth J.D. Cestoda. In: Smyth J.D., editor. In vitro Cultivation of Parasitic Helminthes. - London: CRCpress, 1990. - 137 p.
- 6 Dezaki E. S. et al. Comparison of ex vivo harvested and in vitro cultured materials from *Echinococcus granulosus* by measuring expression levels of five genes putatively involved in the development and maturation of adult worms // Parasitology research. - 2016. - Т. 115, №11. - С. 4405-4416.

С.В. Ялышева, Б.О. Бекманов, Н.Н. Ахметсадыков

ПРОТОСКОЛЕКСТЕРДІ ПРЕСЕГМЕНТАЦИЯ САТЫСЫНА ДЕЙІН IN VITRO ӨСІРУ

Түйін: Мақалада протосколекстерді пресементация сатысына дейін in vitro өсіру әдістемесінің сипаттамасы берілген. Паразиттің даму сатысын зерделеу паразиттің in vitro жағдайындағы ерекшеліктерін зерттеу үшін маңызды болып табылады. Жұмыс барысында PS 3 кезеңіне сәйкес болып келетін, протосколекстерді 20 күн ішінде өсіру бойынша нәтижелер көрсетілген. Зерттеуде Алматы облысында орналасқан қасапханадан алынған материалдар қолданылған. Қоректік ортаның дайындалу кезінде иттің аш ішек бөлігінің ортасын елестететін әдісін қолданған. Протосколекстерді өсіру күшейткіш ретінде иттің өті қолданылған. Жасалған жұмыс нәтижелері таспақұрттарды in vitro жағдайында зерттеудің келешегі барын көрсетеді.

Түйінді сөздер: *Echinococcus granulosus*, эхинококкоз, протосколекс, in vitro, паразитердің өсіру

S. Yalysheva, B. Bekmanov, N. Akhmetsadykov

IN VITRO CULTIVATION OF PROTOSCOLEXES TO THE STAGE OF PRESEGMENTATION

Resume: In the article the technique of in vitro cultivation of protoscoleces to the stage of presegmentation was established. The study of different stages of parasite development is of great importance in understanding the characteristics of this parasite under in vitro conditions. In this paper the results on the protoscoleces growth for 20 days are presented, which corresponds to PS 3 stage. Material for the study was collected from slaughterhouses located in Almaty region. The culture medium reproduces the environment of the small intestine of dog. The dog bile was used as growth activator of protoscoleces. Obtained results of this work show the prospects of in vitro investigations on cestodes.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, echinococcosis, protoscoleces, in vitro, cultivation of parasites