

КОКУЛЬТИВАЦИЯ ПЕЧЕНОЧНОГО СОСАЛЬЩИКА (*FASCIOLA HEPATICA*) С ВИРУСОМ ПОЛИОМИЕЛИТА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Байрамян Н.В.¹, Авакян Т.Г.^{2*}, Каспарова И.С.², Артемян Н.С.²

¹Институт молекулярной биологии НАН РА, Лаборатория клеточной биологии и вирусологии

²ЕГМУ, Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии

Получена: 27.09.2021, рецензирована: 15.10.2021, принята: 27.10.2021.

Ключевые слова: вирус полиомиелита, кокультивация, печеночный сосальщик.

С целью искоренения полиомиелита Всемирная организация здравоохранения в 1988 году начала успешно осуществлять программу по массовой вакцинации всего населения. Снижение заболеваемости полиомиелитом стало возможным благодаря массовой иммунизации живым аттенуированным полиовирусом (штамм Сэбин). В результате, на сегодняшний день чрезвычайно широко распространены вакцинные штаммы вируса, выделяемые во всех странах мира. Вакцинные штаммы вируса полиомиелита способны длительное время бессимптомно циркулировать в кишечнике человека [4]. Длительная циркуляция полиовируса в кишечнике предусматривает его взаимодействие с различными обитателями кишечника человека, в том числе и гельминтами. Последний аспект экологии полиовируса в настоящее время абсолютно не изучен. В этой связи целью данного исследования является изучение взаимодействия полиовирусов вакцинных штаммов с кишечными паразитами человека.

В качестве кишечного гельминта, вследствие своей чрезвычайно широкой распространенности, был избран представитель трематод - *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) – печеночный сосальщик.

Материал и методы исследования

Культивирование *F. hepatica in vitro*. Взрослые *F. hepatica* были выделены из печени крупного рогатого скота и культивировались в условиях *in vitro* в среде RPMI 1640 при температуре $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$ [2].

Вирус. Полиовирус-1 (Сэбин) использовался в дозе $5,0 \log \text{TCD}_{50}/\text{ml}$. Заражение *F. hepatica* вирусом

проводилось одновременно с началом культивирования. Для предотвращения разницы в скорости инактивации вируса вследствие различного pH в контроле и коинкубационной среде нами поддерживался постоянный баланс pH в пределах 7,2-7,4.

Клетки. Нами использовалась культура HeLa, инкубируемая в среде Игл MEM с 10% сывороткой крупного рогатого скота и антибиотиками при температуре $36-36,5^\circ\text{C}$.

Методика моноклональных антител (МАТ) к полиовирусу-1. Нами использовались стандартные МАТ (Affinity BioReagents™, 4620 Technology Drive, Suite 600, Golden, CO 80403 USA, catalog: PA1-73125). Приготовление препаратов проводилось в соответствии с протоколом (www.bioreagents.com).

Результаты и обсуждение

Методом биологического титрования определялись изменения уровней инфекционных титров полиовируса в контроле и при коинкубации с *F. hepatica* (рис. 1).

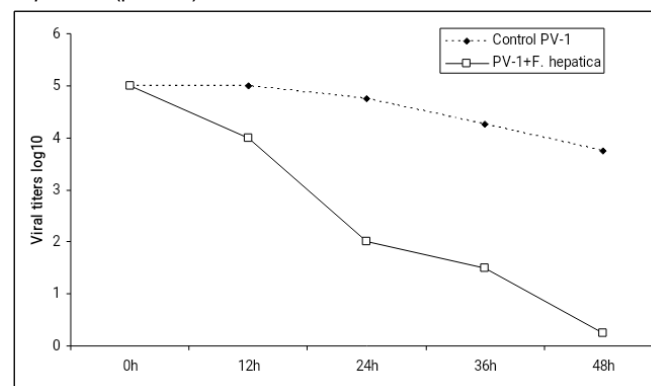


Рис. 1 Динамика вирусных титров в контроле и при кокультивировании с *F. hepatica*

Как следует из рис. 1, в контрольной группе при 37°C происходит медленное снижение вирусного титра с 6,0 до 4,0-4,25 $\text{TCD}_{50}/\text{ml}$. При коинкубации с *F. hepatica* происходило резкое снижение инфекционного титра полиовируса. Достоверная разница с контролем начинала наблюдаться уже на 6-12-ом часе

* АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

Т.Г. Авакян

ЕГМУ, Кафедра гистологии

Адрес: ул. Корюна 2, 0025, Ереван

Эл. почта: avagyantat@gmail.com

Тел.: (+374) 91 42 60 70

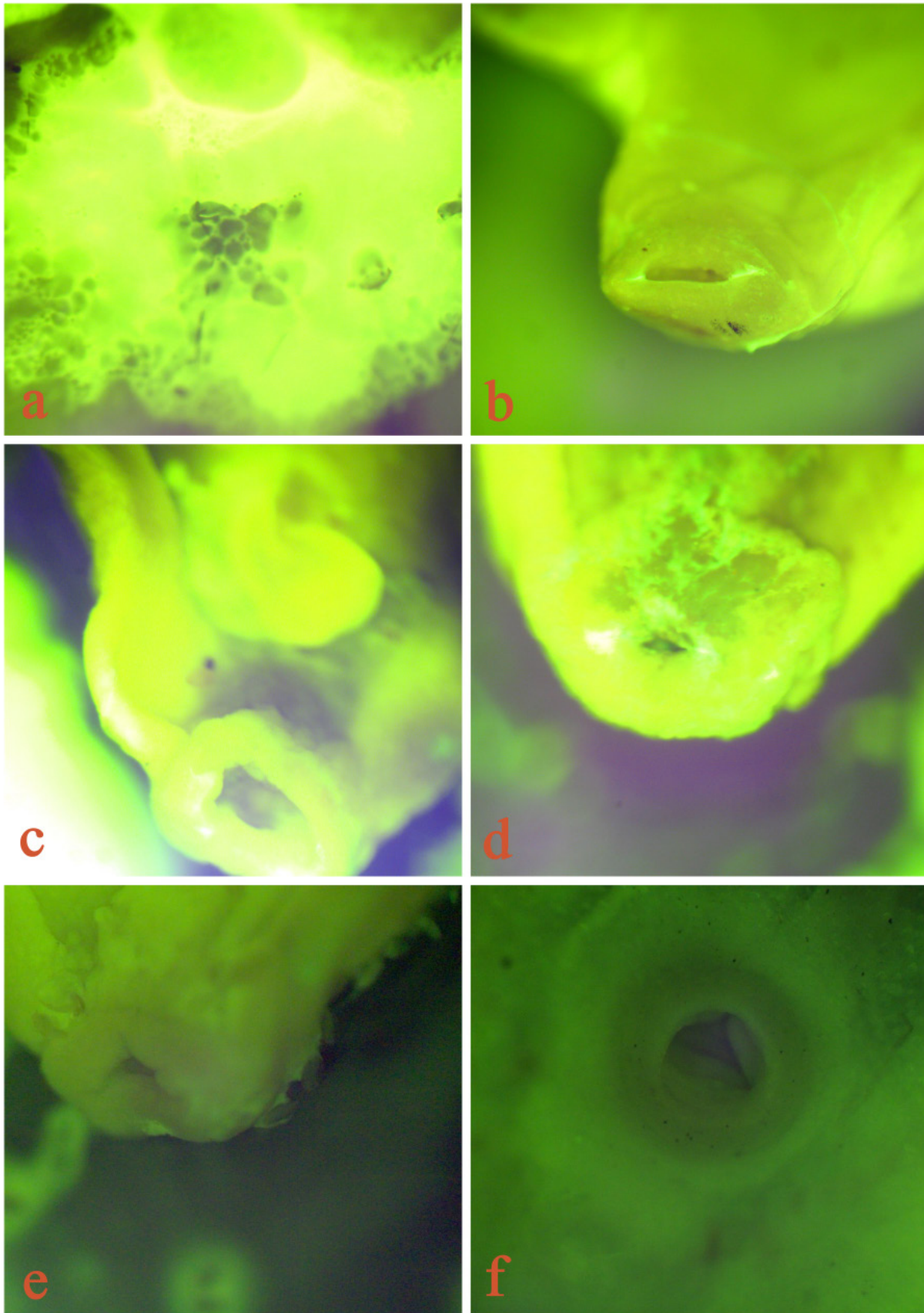


Рис. 2 Скопление МАТ к полиовирусу-1 в области ротовой и брюшной присосок: а)-брюшная присоска с адсорбированными частицами полиовируса 12 часов после инкубации; б)-ротовая присоска 36 часов после инкубации; с, д)-заметно снижение люминесценции моноклональных антител к полиовирусу-1 по сравнению с 12-24 часов после инкубации; е)-контрольная ротовая присоска; ф)- контрольная брюшная присоска, заметно отсутствие люминесценции моноклональных антител к полиовирусу-1.

после начала коинкубации и в дальнейшем нарастала. К завершению эксперимента разница в титрах между контрольной и опытной группами составляла более 3 логарифмов.

Следующим интересующим нас фактором явилась продолжительность выживания *F. hepatica* в контроле при кокультивировании с полиовирусом. Обычно взрослые печеночные сосальщики выживают в условиях *in vitro* около 60 часов [1, 3]. В наших экспериментах выживаемость *F. hepatica* в основном не превышала 24-36 часов, а сравнение выживаемости печеночного сосальщика в контрольных культурах и при кокультивировании с вирусом не выявило достоверных отличий.

Также нами была исследована причина резкого снижения вирусных титров (и, следовательно, инфекционных вирусных частиц) в опытных инкубациях. С этой целью нами проведено обнаружение вирусных частиц с помощью МАТ.

Из рис. 2 следует, что фасциола способна адсор-

бировать частицы полиовируса на своей поверхности и что основная масса адсорбировавшихся частиц вируса находится в области ротовой и брюшной присосок.

Причинами инактивации адсорбировавшегося полиовируса является секреция протеаз фасциолой. Авторами [2, 5] показано, что взрослые *F. hepatica* в условиях *in vitro* способны синтезировать по крайней мере 2 протеазы и выделять их достаточно длительное время. Известно, что оболочка пикорнавирусов, и в частности вируса полиомиелита, состоит из белкового капсида и весьма чувствительна к воздействию протеаз. Следовательно, инактивация вируса идет двумя этапами: сначала вирусные частицы адсорбируются на поверхности *F. hepatica*, а затем разрушаются посредством протеаз гельминта.

Таким образом, взаимодействие *F. hepatica* и полиовируса сводится к адсорбции последнего на поверхности гельминта (в основном в области ротовой и абдоминальной присосок) с последующим разрушением вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бибик О.И., Архипов И.А.// Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. Международной научной конф., М., 2017, Вып. 18, с. 59-62
2. Collins P.R., Stack C.M., O'Neill S.M., Doyle S., Ryan T., Brennan G.P., Mousley A., Stewart M., Maule A.G., Dalton J.P., Donnelly S. Cathepsin L1, the Major Protease Involved in Liver fluke (*Fasciola hepatica*) Virulence. *J. Biol. Chem.*, V. 279, Issue 17, 17038-17046, 2004
3. Daweb B. Maintenance *in vitro* of *Fasciola hepatica*. *Nature* 1954, 174, 654 - 655
4. Kew O.M., R.W. Sutter, E.M. de Gourville, W.R. Dowdle, and M.A. Pallansch. Vaccine-derived poliovirus and the endgame strategy for global polio eradication. 2005, *Annu. Rev. Microbiol.*, 59:587-635
5. Morphew R.M., Wright H.A., LaCourse E.J., Woods D.J., Brophy P.M. Comparative Proteomics of Excretory-Secretory Proteins Released by the *Fasciola hepatica* in Sheep Host Bile and during *in Vitro* Culture ex Host. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6:963-972, 2007

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

ԼՅԱՐԻ ԾՃԱՆԻ (*F. HEPATICA*) ՀԱՄԱՏԵՂ ԿՈՒԼՏԻՎԱՑՈՒՄԸ ՊՈԼԻՈՍԻԵԼԻՏԻ ՎԻՐՈՒՄԻ ՀԵՏ *IN VITRO* ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Բայրամյան Ն.Վ.¹, Ավագյան Տ.Գ.², Կասապարովա Ի.Ս.², Հարթենյան Ն.Ս.²

¹ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլյար կենսաբանության ինստիտուտ, Բջջային կենսաբանության և վիրուսաբանության լաբորատորիա

² ԵՊԲՀ հյուսվածաբանության, բջջաբանության և սաղմաբանության ամբիոն

Բանալի բառեր` լյարդի ծծան, հասնտեղ կուլտիվացում, պոլիոմիելիտի վիրուս:

Աշխատանքում *in vitro* պայմաններում ուսումնասիրված է *F. Hepatica*-ի և պոլիոմիելիտ-1 (Սեբին) պատվաստման շտամի վիրուսի փոխազդեցությունը: Ցույց է տրված, որ վիրուսի առկայությունը չի ազդում լյարդի ծծանի կենսունակության վրա, միաժամանակ նկատելի է պոլիոմիելիտի վիրուսի վարակաբանական տիրոերի արտահայտված նվազում: Վերջինս ստուգիչ խմբի համեմատ դառնում է հավասար

կոնկուբացիայից 12 ժամ հետո, իսկ առավելագույն ցուցանիշների է հասնում 24-36 ժամ կուլտիվացումից հետո:

Մոնոկլոնալ հակամարմինների միջոցով հայտնաբերվել է վիրուսի *F. Hepatica*-ի մակերեսին ադսորբվելու ունակությունը: Աշխատանքում քննարկվում է վիրուսի հնարավոր ապակուլտիվացման մեխանիզմը՝ *F. Hepatica*-ով սինթեզված պրոտեազների ազդեցությամբ:

SUMMARY

CO-CULTIVATION OF *FASCIOLA HEPATICA* WITH THE VIRUS OF POLIOMYELITIS *IN VITRO*

Bayramyan N.V.¹, Avagyan T.G.², Kasparova I.S.², Hartenyan N.S.²

¹*Institute of Molecular Biology of the RA National Academy of Sciences, Laboratory of Cellular Biology and Virology*

²*YSMU, Department of Histology, Embryology and Cytology*

Keywords: *Fasciola hepatica*, co-cultivation, poliomyelitis virus.

This work studies interaction between vaccinal virus strain of poliomyelities-1 (Sebin) and *Fasciola hepatica in vitro*. It has been revealed that the presence of virus doesn't impact the survivance of *Fasciola hepatica*.

At the same time, a prominent decrease of infected virus titer has been observed. The difference between the infected virus titer and the control group of it becomes vivid already in 12

hours after the coincubation. The maximal rate of titer is noticed in 24-36 hours after coincubation.

The ability of virus to be absorbed on the surface of *Fasciola* is revealed with the use of monoclonal antibodies. This study describes the most probable mechanism of deactivating the virus under the impact of proteases produced by *Fasciola*.