

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies

doi:10.15421/nvlvet8201

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 619:616.523:615.381

Особливості застосування екстракту алоє у технології культивування герпесвірусів

К.О. Дроботюк, Т.О. Романишина, В.С. Прокопенко
drobotyuk.kate@gmail.com, tveterinar@gmail.com, ogp.zt2013@gmail.com

*Житомирський національний агроєкологічний університет,
вул. Корольова, 39, Житомир, 10002, Україна*

Вивчені особливості застосування екстракту алоє у технології культивування герпесвірусів на перецелювальній культурі клітин тестикул поросяти. Перед нами були поставлені такі завдання: підібрати культуру клітин та концентрації екстракту алоє для визначення токсичної дози препарату; вивчити прояв ЦПД заражених герпесвірусом культур клітин при різних концентраціях препарату; визначити інфекційну активність вірусу після його пасажування на культурі клітин при застосуванні екстракту алоє. Робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини, в навчально-дослідній лабораторії епізоотології кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Житомирського Національного агроєкологічного університету. Матеріалом досліджень були: перецелювальна культура клітин тестикул поросяти, герпесвірус коней 1-го типу та стерильний екстракт алоє. Культивування культур, зараження їх вірусом і визначення його концентрації після контакту з культурою та внесення екстракту алоє проводили у стерильних умовах за загальноприйнятими методиками. Облік результатів проводили щоденно, звертаючи увагу на зміну кольору середовища, цілісність моношару та наявність клітин у середовищі. Паралельно із зараженими вели спостереження за контрольними, незараженими, культурами клітин. Інкубування припиняли при руйнуванні 90–100% моношару клітин. В результаті проведеної роботи доведено, що екстракт алоє в дозі 0,14–0,28 мг на 1 см³ ростового середовища дозволяє на 2-у добу пересіву спостерігати цілісний щільний моношар у матраці без змін кольору, а також, посилені процеси росту і регенерації клітин та метаболізму епітеліальної тканини перецелювальної культури клітин тестикул поросят, що дає змогу скоротити час на вирощування нового моношару для подальших вірусологічних та імунологічних досліджень. Застосування даного препарату сприяє збільшенню концентрації клітин у матрацах, що, своєю чергою дозволяє підвищити концентрацію вірусу на 1–2 log₂ за використання аналогічних об'ємів ростового середовища без екстракту алоє. Такий модифікований спосіб збільшення біомаси клітин придатний для подальшого розмноження вірусів і виготовлення діагностичних антигенів з меншими економічними витратами. Використання даного методичного підходу дозволить вирішити низку завдань, пов'язаних з накопиченням вірусів та виробництвом препаратів для діагностики та профілактики вірусних інфекцій.

Ключові слова: перецелювальна культура клітин тестикул поросяти, культивування, екстракт алоє, герпесвірус коней.

Особенности использования экстракта алоэ в технологии культивирования герпесвирусов

Е.А. Дроботюк, Т.А. Романишина, В.С. Прокопенко
drobotyuk.kate@gmail.com, tveterinar@gmail.com, ogp.zt2013@gmail.com

*Житомирский национальный агроэкологический университет,
ул. Корольова, 39, Житомир, 10002, Украина*

В статье изучены особенности использования экстракта алоэ в технологии культивирования герпесвирусов на перевиваемой культуре клеток тестисов поросёнка. Перед нами были поставлены такие задания: подобрать культуру клеток и

Citation:

Drobotyuk, K.O., Romanishyna, T.O., Prokopenko, V.S. (2017). Peculiarities of aloe extract application in the cultivation technology of herpes viruses. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(82), 3–7.

концентрації екстракта алоє для определения токсической дозы препарата; изучит проявление ЦПД зараженных герпесвирусом культур клеток при разных концентрациях препарата; определит инфекционную активность вируса после его пасажиrowания на культуре клеток при использовании экстракта алоє. Работу проводили на факультете ветеринарной медицины, в учебно-экспериментальной лаборатории эпизоотологии кафедры микробиологии, фармакологии и эпизоотологии Житомирського національного агроекологического университета. Для исследований использовали: перевиваемую культуру клеток тестикул поросенка, герпесвирус лошадей 1-го типа и стерильный экстракт алоє. Культивирование культур, заражение их вирусом и определение его концентрации после контакта с культурой и добавления экстракта алоє проводили в стерильных условиях по общепринятым методикам. Учет результатов проводили ежедневно, обращая внимание на изменение цвета среды, целостность моношара и наличие клеток в среде. Параллельно с зараженными наблюдали за контрольными, незараженными, культурами клеток. Инкубирование останавливали тогда, когда 90–100% моношара клеток было разрушено. В результате сделанной работы было доказано, что экстракт алоє в дозе 0,14–0,28 мг на 1 см³ ростовой среды позволяет на 2-ой день посева наблюдать целостный моношар в матрасе без изменения цвета, а также, усиленный рост и регенерацию клеток и метаболизма эпителиальной ткани перевиваемой культуры клеток тестикул поросенка, что позволяет сократить время для выращивания нового моношара для дальнейших вирусологических и иммунологических исследований. Использование данного препарата увеличивает концентрацию клеток в матрасах, что, в свою очередь, позволяет повысить концентрацию вируса на 1–2 log₂ при использовании аналогичных объемов среды без экстракта алоє. Такой модифицированный способ увеличения биомассы клеток подходит для дальнейшего размножения вирусов и изготовления диагностических антигенов с меньшими экономическими растратами. Использование данного методического подхода позволит решить ряд задач, связанных с накоплением вирусов и производством препаратов для диагностики и профилактики вирусных инфекций.

Ключевые слова: перевиваемая культура клеток тестикул поросенка, культивирование, экстракт алоє, герпесвирус лошадей.

Peculiarities of aloe extract application in the cultivation technology of herpes viruses

K.O. Drobotiuk, T.O. Romanyshyna, V.S. Prokopenko
drobotyuk.kate@gmail.com, tveterinar@gmail.com, ogp.zt2013@gmail.com

Zhytomyr National Agroecological University,
Koroleva Str., 39, Zhytomyr, 10002, Ukraine

In the article there are studied peculiarities of aloe extract application in the cultivation technology of herpes viruses on the re-cultivating culture of testicular piglets cells. We were faced with the following tasks: to select a cell culture and aloe extract concentration to determine the toxic dose of the drug; to study the manifestation of the cytopathic effect in cell cultures infected with herpesvirus at different drug concentrations; to determine infectious virus activity after its passage on the cells culture with the use of aloe extract. The work was carried out at the faculty of veterinary medicine, in the educational-research laboratory of epizootology department of microbiology, pharmacology and epizootology of the Zhytomyr National Agroecological University. The research materials included: the re-cultivating culture of testicular piglets, horse herpes virus of the first type and sterile aloe extract. Cultivation of crops, infection with the virus and determination of its concentration after contact with culture and the introduction of aloe extract were carried out under sterile conditions according to the generally accepted methods. The results were recorded daily, paying attention to the environment color changing, the integrity of the monolayer and the presence of cells in the medium. Along with the infected cells we were observing additional, uninfected, cultures of cells. The Incubation process was stopped at the destruction of 90–100% cell monolayer. As a result of this work, it is proved that the aloe extract in a dose of 0.14–0.28 mg per cm³ of growth medium allows to observe for the 2nd day of replanting a solid dense monolayer in the mattress without color changing, as well as enhanced growth and regeneration of cells and the metabolism of the epithelial tissue of the re-cultivating culture of testicular piglets, which makes it possible to shorten the time to grow a new monolayer for further virological and immunological studies. The use of this drug helps to increase cells concentration in the mattresses, which, in turn, can increase the concentration of the virus to 1–2 log₂ for the use of similar amounts of growth medium without aloe extract. Such modified way to increase the biomass of cells is suitable for the further multiplication of viruses and the production of diagnostic antigens with lower economic costs. The use of this methodical approach will allow to solve a number of tasks related with accumulation of viruses and the production of drugs for the diagnosis and prevention of viral infections.

Key words: re-cultivating cultures of testicular piglets cells, cultivation, aloe extract, herpesvirus of horses.

Вступ

Культури клітин (первинні культури, штами клітин і клітинні лінії, виготовлені з тканин лабораторних тварин) використовують для виділення і розмноження вірусів, їхньої ідентифікації, накопичення як антигенів при виготовленні діагностикумів і протівірусних вакцин в сучасних вірусологічних лабораторіях і на біофабриках. Впровадження культури клітин у вірусологічну практику відсувало на другий план

використання лабораторних тварин і курячих ембріонів.

Масове вирощування клітин у культурі є центральною ланкою технологічного процесу виробництва вірусних препаратів. Вона знімає видові обмеження культивування вірусів, оскільки *in vitro* можна вирощувати будь-які клітини різних видів тварин. Ця стадія визначає кількість і якість клітин та тим самим в цілому технологію отримання біомаси вірусу. Немає єдиної клітинної культури, яка була б придатною для виділення будь-якого вірусу. Тому в

лабораторній діагностиці зазвичай застосовують кілька видів культур залежно від того, який вірус передбачається виділити. Ефективність технології отримання вірусної сировини залежить від використання штаму вірусу, клітинної системи, способу накопичення біомаси клітин і вірусу тощо.

У вірусологічній практиці найчастіше використовують одношарову (моношарову) культуру клітин. Це клітини *in vitro*, одержані в результаті диспергування тканин, які прикріплюються до субстрату і розмножуються, утворюючи моношар (на склі пробірок, флаконів, матраців).

Для культивування культури клітин використовують поживні середовища до яких додають ембріональну сироватку та антибіотики (Golubev et al., 1976; Sergeev, 1976; Vahtin and Sominina, 1988; Sjurin et al., 1991; Ganiev, 2007). Залежно від типу культури клітин середовища різняться своїм якісним та кількісним складом. Експериментальним шляхом автори добирали оптимальні концентрації речовин, що сприяли якійсній проліферації та функціонуванню культури (Sjurin et al., 1991).

Так, у певних середовищах міститься подвійна концентрація амінокислот, лізин, серин, піруват заліза, глюкоза, альбуміни, трансферин, ліпіди, біотин, вітамін B12, селеніт натрію (Iscove and Melchers, 1979; Iscove, 1984), параамінобензойна кислота, глутатіон, інозит (Patterson and Dell'orco, 1978), цинк, купрум, ненасичені жирні кислоти. Ряд авторів досягали безсироваткового росту різних клітин, застосовуючи стандартні середовища і замінюючи сироватку специфічним для даного клітинного типу набором гормонів, гормоноподібних ростових факторів, транспортних білків (глюкагон, фолікулотропін, гідрокортизон, прогестерон, інсулін, трансферин) (Barnes and Sato, 1980).

Недоліком таких методичних підходів є те, що більшість стимуляторів є дороговартісними, високоспецифічними (фактори росту) і зазвичай отримуються з сироватки крові, що ставить під сумнів відсутність вірусної чи пріонної контамінації. Актуальним питанням сьогодення залишається пошук недорогих стимуляторів росту, при застосуванні яких концентрацію будуть зберігатись морфологічні особливості клітин

культури, збільшиться їх біомаса (для накопичення вірусу) та відповідно підвищиться концентрація вірусу при внесенні його у досліджувані культури.

Поставлене завдання ми спробували вирішити шляхом застосування стерильного екстракту алое, який прискорює репаративні та проліферативні процеси у тканинах макроорганізмів.

Метою нашої роботи було визначити особливості застосування екстракту алое у технології культивування герпесвірусів.

Для досягнення мети перед нами були поставлені такі завдання:

- 1) підібрати культуру клітин та концентрації екстракту алое для визначення токсичної дози препарату;
- 2) вивчити прояв ЦПД заражених герпесвірусом культур клітин при різних концентраціях препарату;
- 3) визначити інфекційну активність вірусу після його пасажування на культурі клітин при застосуванні екстракту алое.

Матеріал і методи досліджень

Робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини, в навчально-дослідній лабораторії епізоотології кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Житомирського Національного агроекологічного університету.

Матеріалом досліджень були перещеплювальна культура клітин тестикул поросяти, герпесвірус коней 1-го типу (штам «Буковина») та стерильний екстракт алое. Для культивування культури клітин використовували скляні матраці об'ємом 20 см³, які зберігали в термостаті при +37,5°.

Через 2–3 доби після пересіву формувался 90–100% моношар, котрий використовували для зараження вірусом і внесення середовища з різними концентраціями екстракту алое. Зараження вірусом і визначення його концентрації після контакту з культурою проводили за загальноприйнятими методиками (Sjurin et al., 1991). При цьому ростове середовище зливали і замінювали на підтримуюче з вмістом препарату. Схема постановки експерименту наведена в таблиці 1.

Таблиця 1

Схема внесення екстракту алое на моношар культури клітин тестикул поросяти

Одиниця вимірювання / № досліду	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Об'єм середовища у матраці (мл)	0	1	1,5	1,75	1,875	1,94
Об'єм екстракту алое у матраці (мл)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063
Концентрація екстракту алое у матраці (%)	100	50	25	12,5	6,25	3,125
Маса сухої речовини алое в перерахунку на 1см ³ середовища (мг/см ³)	2,25	1,125	0,56	0,28	0,14	0,07

При вивченні дії різних концентрацій екстракту алое були використані 18 матраців-флаконів (з розрахунку – 3 матраці на кожну дозу препарату), які культивували на ростовому середовищі такого складу: середовище 199 (90%) + 10% сироватки великої рогатої худоби, гентаміцин та екстракт алое. Екстракт алое вносили на клітини в дозах від 0,063 до 2 см³ на

1 матрац. Вищевказані культури клітин культивували протягом 10 днів.

Облік результатів проводили щоденно, звертаючи увагу на зміну кольору середовища, цілісність моношару та наявність клітин у середовищі.

Паралельно із зараженими вели спостереження за контрольними, незараженими, культурами клітин.

Інкубування припиняли при руйнуванні 90–100% моношару клітин. Гемаглютинувальну активність вірусу з усіх дослідних матраців визначали у РГА [6].

Результати та їх обговорення

Результати вірусологічних досліджень навчально-дослідної лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Житомирського Національного агроєкологічного університету дозволили нам зупинитись на перещеплювальній культурі тестикул поросят і адаптованому до неї герпесвірусу першого типу (штам «Буковина») з визначеною гемаглютинувальною активністю 4 ГАО.

Для вивчення стану культур під впливом різних доз екстракту алое нами було сформовано 6 варіантів

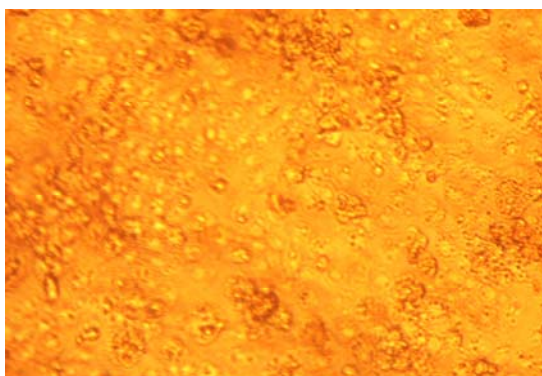


Рис. 1. Стан моношару контрольної культури клітин тестикул поросят на 3-ю добу культивування (×120)

дослідів. Використовували по 3 матраці на кожну дозу екстракту алое відповідно для дози 2,25 мг/см³ – матраці № 1, 2, 3; 1,125 мг/см³ – № 4, 5, 6; 0,56 мг/см³ – № 7, 8, 9; 0,28 мг/см³ – № 10, 11,12; 0,14мг/см³ – №13, 14, 15; 0,07 мг/см³ – № 16, 17, 18. Контролем служили 3 матраці культури такого ж віку без застосування препарату (рис. 1).

За культурами спостерігали щодня візуально – за змінами кольору середовища і під мікроскопом при малому збільшенні (8×15), звертаючи увагу на форму і розміри клітин та рівномірність моношару. Як видно з рисунка 2, при застосуванні екстракту алое на клітини тестикул поросят у дозах 0,14–0,56 на 2-у добу експерименту міжклітинні зв'язки стають більш чіткими, а клітини з яскравими морфологічними ознаками.

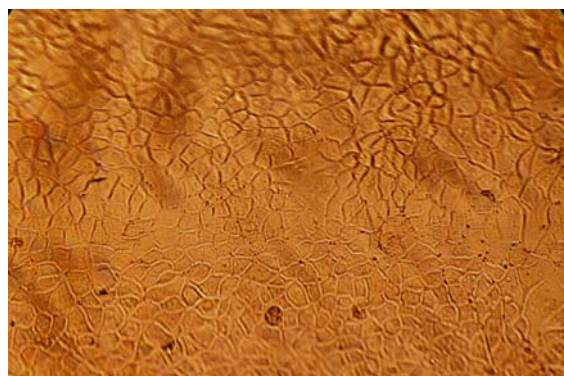


Рис. 2. Стан моношару культури клітин тестикул поросят на 3-ю добу культивування з концентрацією алое 0,14 мг/см³ (×120)

Колір середовища у перших двох варіаціях досліді змінювався після внесення екстракту алое з яскраво-гранатового кольору на світло-червоний, що пояснюємо повним припиненням росту клітин, а в останньому змінився до яскраво-жовтого, отже тут препарат не одразу подіяв на геном клітин.

На третю добу після зараження у матрацах № 1–6 і на четверту в матрацах № 7–9 цілісність моношару порушилась (рис. 3). Через 24 години у перших двох експериментах відбулася повна загибель клітин.

У четвертому і п'ятому досліді спостерігали наявність клітин з хвостоподібними відростками. При вивченні дози 0,14 мг/см³ і 0,28 мг/см³ на четверту

добу культивування у матрацах № 10–12 і 13–15 спостерігати цілісний щільний моношар без змін кольору, збільшення розміру клітин, міжклітинні зв'язки ставали більш чіткими, а також посилювалися процеси росту і регенерації клітин та метаболізму. Цитопатична дія вірусу почала проявлятися на шосту добу після внесення вірусу (рис. 4). У четвертій варіації досліді на сьому добу клітин з хвостоподібними відростками ми вже не спостерігали. Повне руйнування моношару відбулося у третьому досліді на 8, а в четвертому – на 9 добу. На десяту добу всі матраці були вибракувані.

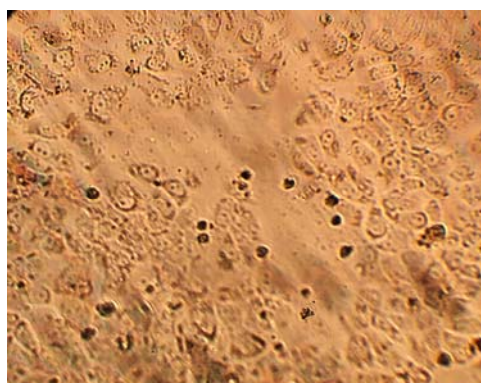


Рис. 3. Прояв ЦПД на культурі клітин тестикул поросят з дозою екстракту алое 2,25 мг на 1 см³, на четверту добу після внесення вірусу. ×240

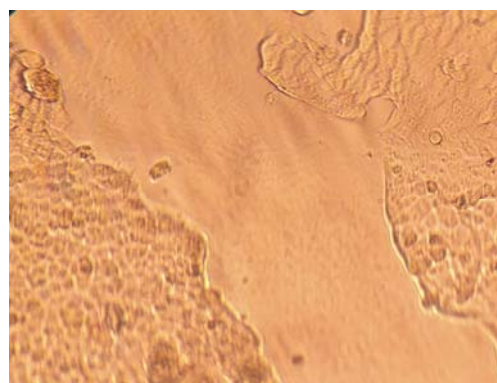


Рис. 4. Стан культури клітин тестикул поросят з дозою екстракту алое 0,14 мг на 1 см³, на шосту добу після внесення вірусу. ×240

У контрольних матрацах змінився колір середовища з яскравого-оранжевого до жовтого, а відшарування клітин почалося тільки на 10 добу, внаслідок старіння моношару.

Таким чином, екстракт алое високих концентрацій (вище ніж 0,56 мг на 1 см³) проявляє на культуру клітин консервуючу та пригнічуючу дію, про що свідчить відсутність моношару, зміна кольору середовища та наявність мертвих клітин в середовищі.

Як видно з результатів експерименту, концентрації екстракту алое 0,14–0,28 мг на 1 см³ *in vitro* стимулюють процеси регенерації клітин та метаболізму епітеліальної тканини перещеплюваної культури клі-

тин тестикул поросят та відповідно сприяють збільшенню концентрації клітин у матраці для накопичення вірусу.

Для визначення активності вірусу всі матраци із культурами клітин підлягали послідовному триразовому заморожуванню-відтаюванню, що забезпечувало руйнування стінок клітин і вихід вірусу. Індикацію наявності антигену та визначення його концентрації проводили у культуральній рідині всіх дослідних матраців. Результати гемаглютинувальної активності герпесвірусу на культурах клітин тестикул поросяти, визначення РГА подані у таблиці 2.

Таблиця 2

Гемаглютинувальна активність герпесвірусу в дослідних матрацах, визначена у РГА

Активність вірусу, ГАО	Варіант досліджу					
	1	2	3	4	5	6
	1 log ₂	2 log ₂	2 log ₂	3 log ₂	4 log ₂	2 log ₂

Як видно з таблиці 1, концентрації екстракту алое 0,14–0,28 мг на 1 см³ *in vitro* сприяє збільшенню концентрації вірусу в матрацах, що пояснюємо збільшенням біомаси клітин у матраці як об'єктів для розмноження і відповідно накопичення герпесвірусів.

Отже, однією з переваг застосування екстракту алое у культивуванні клітинних культур серед інших об'єктів дослідження є можливість тривалого спостереження за життєдіяльністю клітин, за станом окремих клітинних органел, за процесами, що відбуваються в клітинах, фіксувати стан культури з урахуванням кількісних і якісних параметрів.

Висновки

1. Додавання екстракту алое в дозі 0,14–0,28 мг/см³ ростового середовища дозволяє на 2-у добу пересіву спостерігати цілісний щільний моношар у матраці без змін кольору, а також посилені процеси росту і регенерації клітин та метаболізму епітеліальної тканини перещеплюваної культури клітин тестикул поросят, що дає змогу скоротити час на вирощування нового моношару для подальших вірусологічних та імунологічних досліджень.

2. Застосування даного препарату сприяє збільшенню концентрації клітин у матрацах, що своєю чергою, дозволяє підвищити концентрацію вірусу на 1–2 log₂ за використання аналогічних об'ємів ростового середовища без екстракту алое.

3. Такий спосіб збільшення біомаси клітин придатний для подальшого розмноження вірусів і виготовлення діагностичних антигенів з меншими економічними витратами.

Перспективи подальших досліджень. Використання даного методичного підходу дозволить вирішити ряд завдань, пов'язаних з накопиченням вірусів і виробництвом препаратів для діагностики та профілактики вірусних інфекцій.

Бібліографічні посилання

Vahtin, Ju.B., Sominina, A.A. (1988). *Metody kul'tivirovaniya kletok.* L.: Nauka (in Russian).

Ganiev, I.M. (2007). *Primenenie kombinacij syvorotok krovi razlichnyh vidov zhivotnyh dlja kul'tivirovaniya kletok i reprodukcii virusov.* avtoref. diss. na soisk. uch. st. kand. biol. nauk; 03.00.23 «Biotehnologija» Ul'janovsk, 22 (in Russian).

Golubev, D.B., Sominina, A. A., Medvedeva, M.N. (1976). *Rukovodstvo po primeneniju kletochnyh kul'tur v virusologii.* M. (in Russian).

Novohatskij, A.S. (1979). *Tkanevye i kletochnye kul'tury v virusologii i molekularnoj biologii.* M. (in Russian).

Sergeev, V.A. (1976). *Reprodukcija i vyrashhivanie virusov zhivotnyh.* M.: Kolos (in Russian).

Sjurin, V.N., Belousova, R.V., Fomina, N.V. (1991). *Diagnostika virusnyh boleznej zhivotnyh.* Spravochnik. M. : Agropromizdat (in Russian).

Freshni, R. (1989). *Kul'tura zhivotnyh kletok.* Metody. Perevod s ang. pod red. R. Freshni. M.: Mir (in Russian).

Iscove, N.N., Melchers, F. (1979). *Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide reactive B lymphocytes.* J. Exp. Med. 147, 923–933.

Iscove, N.N. (1984). *Culture of lymphocytes and hemopoietic cells in serum-free medium. Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells.* New York, 169–185.

Patterson, M.K., Dell'orco, R.T. (1978). *Preparation of McCoy's medium 5A.* Tissue Cult. Assoc. Manual. 4, 737–740.

Ham, R.G., McKeehan, W.L. (1979). *Media and growth requirements.* Methods in enzymology. New York. 58, 44–93.

Ham, R.G. (1963). *An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines.* Exp. Cell Res. 29, 515–526.

Ham, R.G. (1984). *Selective media for cell separation.* New York. 3, 20.

Barnes, D., Sato, G. (1980). *Serum-free cell culture: a unifying approach.* Cell. 22, 649–655.

Received 20.09.2017

Received in revised form 23.10.2017

Accepted 27.10.2017