

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЦИТОПАТИЧНОЇ ДІЇ ЕНТЕРОВІРУСІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ВНК-21

З. С. КЛЕСТОВА¹, Е. М. ПОПОВА², Г. А. ЛАДИСЮК²

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів, м. Київ

²Національний авіаційний університет, м. Київ

Описано небезпеку вірусних захворювань, а саме хвороб, що спричиняються ентеровірусами. Дана характеристика культури клітин як біологічної моделі для визначення інфекційної активності вірусів, та наведені її переваги серед інших біологічних моделей.

Ключові слова: культура клітин, віруси, патогенез, цитопатична дія, інфекційна активність.

Вступ. Вірусні інфекції являють собою одну з численних груп інфекційних захворювань різних за клінічним перебігом і патогенезом, володіють високою контагіозністю і здатні викликати епідемії, пандемії, епізоотії [18].

На сьогоднішній день віруси залишаються одними з основних та найнебезпечніших збудників різноманітних захворювань людей, тварин та рослин. Віруси призводять до загибелі інфікованих організмів, чим наносять економічні збитки країнам, де виникають епідемії та епізоотії.

Серед багатьох вірусних інфекцій людини все ще залишається актуальним дослідження грипу, який, незважаючи на величезні зусилля науковців багатьох країн, все ще не переможений остаточно. Чумою 20 сторіччя є СНІД – одне з найнебезпечніших сучасних захворювань людини. На даний час загально визнаним є існування онкогенних вірусів, які спричиняють злоякісні пухлини в організмі людини [1].

Небезпечними є також ентеровіруси, які можуть викликати різноманітні хвороби: гепатит, пневмонію, кон'юктивіт, перикардит, міокардит, поліомієліт. Також велику небезпеку становить факт тропізму ентеровірусів до нервової тканини, епітеліальних клітин, що проявляється у їх морфологічній зміні [2]. Вплив ентеровірусів при вагітності може призвести до внутрішньоутробного враження плоду [2, 14].

Ентеровіруси відомі своєю здатністю викликати не лише гострі інфекційні захворювання, але, і в деяких випадках, хронічну та соматичну патологію. Особливістю ентеровірусів є те, що один і той же вид ентеровірусів може викликати різні за симптоматикою захворювання і, навпаки, нерідко при спалаху одного захворювання виявляють штами ентеровірусів різних типів [2].

Інкубаційний період при ентеровірусних захворюваннях складає від 2 до 35 днів. Відомо також, що ентеровірусні захворювання характеризуються багатоманітністю клінічних проявів, які можуть часто поєднуватись [2].

Для попередження цих захворювань створюються вакцини. Їх застосування запобігло значному колу ентеровірусних інфекцій, наприклад поліомієліт. За допомогою вакцин подолано багато хвороб, які раніше вважалися невиліковними. На виробництво вакцин витрачають великі кошти, спостерігається швидкий розвиток технології виробництва імунобіологічних препаратів, що є перспективним і важливим напрямком [1].

Для вирішення проблеми поширення захворювань необхідно досліджувати вплив вірусів на живі організми. Для зручності використовуються біологічні моделі, однією з яких є культури клітин.

Клітинні культури – це генетично однорідні популяції клітин, що ростуть у постійних умовах оточуючого середовища. Це можуть бути штами нормальних клітин людини, тварин, рослин або тканин злоякісних пухлин [3]. З появою методу культури клітин діагностика вірусних інфекцій піднялася на якісно вищий щабель. Культури клітин широко використовуються у цитогенетичних, біохімічних, молекулярних та різноманітних лабораторних дослідженнях [4, 5].

При роботі з культурами клітин обов'язкове дотримання правил асептики і ретельна підготовка посуду та реагентів. Культивування клітин можна здійснювати у флаконах із нейтрального скла. При роботі з культурою клітин використовують балюмоборосилікатне, кварцове або нейтральне скло, яке не призводить до підвищення лужності середовища, а також перед використанням скло необхідно кип'ятити в слабкому розчині кислоти для підвищення ступеня чистоти скла для нейтралізації токсичної дії скла на клітини [7]. На першій стадії вирощують клітини у ростовому середовищі, що містить у своєму складі 10 % сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Після утворення клітинами суцільного моношару, культуральне середовище замінюють на підтримуюче. При цьому застосовують зазвичай оброблену сироватку крові великої рогатої худоби, так як вона сприяє росту клітин та не містить інгібіторів ентеровірусів [15].

З культурами клітин порівняно легко працювати у лабораторії, на відміну від інших методів – вирощування вірусів на курячих ембріонах, або у організмі живих тварин. Крім того, у моношарі культури клітин можна добре вивчити цитопатичну дію вірусів, за різними ознаками (округлення клітин, відкріплення їх від скла, руйнування, поява нових включень). При роботі з культурами клітин суттєві результати можуть бути отримані при роботі з невеликою кількістю культур клітин.

Метою даної роботи є вивчення особливостей росту клітини у культурі, вивчення цитопатичної дії ентеровірусів на клітину, та механізми впливу на вірус противірусних препаратів та їх комбінацій.

Для роботи доцільно використовувати як первинні, так і перещеплювальні (постійні) клітинні культури тварин, що є найбільш зручною і чутливою моделлю для первинного виділення, накопичення та ідентифікації багатьох вірусів, які викликають захворювання різноманітних видів сільськогосподарських тварин та людей [3].

ВНК-21 – це перещеплювальна сублінія клітин нирок новонародженого сирійського хом'ячка [18], яка вперше була одержана у 1961 році в Англії Макферсоном і Стокером, з часом вона поширилася по всьому світу.

Відомо, що віруси розмножуються лише у живих клітинах, і виділення збудника в зараженій культурі клітин – один з основних методів у діагностиці вірусної інфекції, а також при визначенні інфекційних властивостей вірусів [8]. Оскільки більшість патогенних вірусів відрізняють за тканинною та типовою специфічністю, то майже до кожного виду вірусу можна підібрати відповідні чутливі клітинні та тканинні культури, а також створити умови культивування та розмноження вірусу, що забезпечують чутливі клітини [7].

При роботі з вірусним матеріалом, на першому етапі здійснюється зараження культури клітин вірусомісною рідиною, приготованою з клінічного матеріалу [4].

Для пасажування культури клітин використовуються поживні середовища, основними компонентами яких є неорганічні солі, фактори росту, антибіотики, вуглеводи, які слугують джерелами енергії та амінокислот.

Україна отримала клітини ВНК-21 із Англії, Франції, Мексики, США, Швеції. Отримані клітини зберігаються у профільних закладах та культивуються у різних лабораторіях за потреби [17].

Культура клітин ВНК-21 росте, прикріплюючись до скла, після додавання до клітинної суспензії поживного середовища. Клітини проходять стадії росту, займають наданий їм простір на поверхні скла. З часом, коли біомаса наростає, клітини зменшуються у розмірах, і середовище виснажується, що є сигналом для наступного пасажу. Після достатнього накопичення біомаси культури клітин її можливо заразити вірусомісним матеріалом. Таким чином, можна спостерігати етапи взаємодії вірусу з клітиною.

Ентеровіруси добре розмножуються у первинних культурах нирок мавп, хом'яків, інших тварин та людини, викликаючи характерні цитопатологічні зміни. До них відносяться наступні культури клітин : RD (клітини рабдоміосаркоми людини), які найбільш чутливі до вірусів групи ECHO; FL

(клітини амніона людини); BMG (клітини нирок африканської зеленої мавпи), у яких активно репродукуються віруси поліомієліта, Коксакі А, В, більшість вірусів групи ЕСНО; а також клітини Her-2 (клітини карциноми гортані людини), в яких добре розмножуються попідомавіруси, віруси Коксакі В. Крім перещеплювальних, досить чутливими є первинні диплоїдні культури клітин, серед яких рекомендуються первинно трипсинізовані клітини НЕЛ (клітини нирок ембріона людини) і ФЕЛ (фібробласти ембріона людини). Для роботи використовуються клітини зі сформованим моношаром на 2–3 добу їх росту *in vitro* [15].

Матеріали та методи досліджень. На першій стадії вирощували клітини, які помістили у ростове середовище, що містить 10 % сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Як тільки клітини утворювали суцільний моношар, культуральне середовище замінювали на підтримуюче [15].

Зручною біологічною моделлю для визначення цитотоксичної дії ентеровірусів на сприйнятливі до них організми є дослідження в культурах клітин. Найбільш часто для виділення ентеровірусів застосовують перещеплювальні клітини людини та мавп.

Цитопатичний ефект розмноження вірусу полягає у таких змінах: клітини округляються, зморщуються, в ядрах клітин спостерігаються нехарактерні для даної культури зміни, з часом змінюються світлозаломлюючі властивості клітин, в кінцевій фазі спостерігається відокремлення клітин від посуду [2].

Труднощі у пошуку антивірусних хіміотерапевтичних засобів зумовлені внутрішньоклітинним розвитком вірусів й особливостями їх репродукції, що тісно пов'язано з метаболізмом клітин [9–11].

Серед ентеровірусів тварин циркулюють різні серотипи і штами. Так, ентеровіруси свиней 6 серогрупи F7 штаму ізольований у культурі клітин нирок свиней. Вірус зберігали при температурі -96°C . Для підтримання інфекційної активності вірусу у культурі клітин його пересівали 1 раз на рік. *Enteorovirus suis* містить у своєму складі одну нуклеїнову кислоту – РНК, що містить більше 7500 нуклеотидів. Вірус має розмір близько 20–30 нм, 32 капсомери, 32–37S,

білки – 70 %, РНК – 30 %, ізометричні частинки у вигляді ікосаедра з кубічним типом симетрії, суперкапсидної оболонки немає, стійкий до ефіру, хлороформу, дезоксихлорату натрію, рН 3,0–10,0, стійкий до зовнішніх та хімічних чинників, інактивується 0,3 % розчином формальдегіду, 0,1 N розчином соляної кислоти. Цитопатичний ефект вірусу проявляється через 18–24 годин.

Результати та їх обговорення. Ентеровіруси тварин досліджували вітчизняні дослідники (Деркач І.М., Романенко В.П., Білоштан В.Б., Тацька В.Н., Мельниченко О.М., Досан С.І. та інші). Дані щодо визначення інфекційних властивостей ентеровірусів свиней, дані наведені у таблиці 1, де показана інфекційна активність різних штамів ентеровірусів свиней у культурах клітин ВНК-21 та СПЕВ [19, 20].

Таблиця 1

Інфекційна активність різних штамів ентеровірусів свиней у культурах клітин ВНК-21 та СПЕВ

Культура клітин	Автор	Час прояву	Титр Ig ТЦД ₅₀ /см ³	Штам вірусу
СПЕВ	Деркач, 2009	-	9,04±0,17	ЕВС F7
ВНК-21	Деркач, 2009	-	7,83±0,17	ЕВС F7
СПЕВ	Деркач, 2009	-	8,71±0,27	ЕВС Д 229
ВНК-21	Деркач, 2009	-	7,08±0,08	ЕВС Д 229
ВНК-21	Деркач, 2009	-	5,13±0,24	ЕВС V13 (8)
СПЕВ	Деркач, 2009	-	8±0,26	ЕВС V13 (8)
СПЕВ	І. М. Деркач В.П. Романенко, В.Б. Білоштан	144	7,25 ±0,14	Хвороба Тешена
ВНК-21	І. М. Деркач, В. П. Романенко, В. Б. Білоштан	72	6,24 ±0,14	Хвороба Тешена
СПЕВ	І. М. Деркач, В. П. Романенко, В. Б. Білоштан	48	8,08	Хвороба Тешена
ВНК-21	І. М. Деркач, В. П. Романенко, В. Б. Білоштан	48	9,42 ±0,08	Хвороба Тешена

З представлених у таблиці даних витікає, що прояв інфекційної активності вірусу залежить від часу спостереження, культури клітин та штаму вірусу, який діє.

У таблиці 2 та 3 наведені результати дії вірусу ЕВС 6 серогрупи штаму F7 2 протягом 4 пасажів у культурі клітин ВНК-21.

Таблиця 2

Динаміка цитотоксичної дії вірусу ЕВС 2 пасажу при визначенні інфекційної активності у культурі клітин ВНК-21

Розведення вірусу	Час спостереження, години			
	24	48	72	96
10^{-1}	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-2}	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-3}	-	4/4	4/4	4/4
10^{-4}	-	4/4	4/4	4/4
10^{-5}	-	4/4	4/4	4/4
10^{-6}	-	-	3/4	4/4
10^{-7}	-	-	-	1/4
10^{-8}	-	-	-	-

З таблиці 2 і 3 можна зробити висновок, що культура клітин ВНК-21 є сприйнятливою до вірусу ЕВС, інфекційна дія вірусу зростала з кожним пасажем.

Згідно з даними таблиці 2 титр вірусу ЕВС 6 серогрупи, F7 становив $6,66 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Таким чином, вивчено динаміку змін інфекційної активності ентеровірусу свиней протягом його реплікації у культурі клітин ВНК-21 за 96 години.

Динаміка цитотоксичної дії вірусу ЕВС четвертого пасажу при визначенні інфекційної активності у культурі клітин ВНК-21

Розведення	Час спостереження, години			
	24	48	72	96
10^{-1}	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-2}	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-3}	-	4/4	4/4	4/4
10^{-4}	-	4/4	4/4	4/4
10^{-5}	-	4/4	4/4	4/4
10^{-6}	-	-	4/4	4/4
10^{-7}	-	-	-	2/4
10^{-8}	-	-	-	-

З викладеного матеріалу можна зробити висновок, що проблема вивчення впливу вірусів на організми є актуальною, над нею працюють багато дослідників. Небезпека ентеровірусних хвороб пов'язана з їх негативною дією на живий організм, та з наслідками, які можуть викликати дані хвороби. Дана тема потребує подальших досліджень. Ентеровіруси відомі своєю здатністю викликати не лише гострі інфекційні захворювання, але і в деяких випадках хронічну та соматичну патологію.

Проаналізувавши літературні дані дослідників, які працювали з ентеровірусами та культурою клітин ВНК-21, можемо зробити висновок, що культура клітин ВНК-2 є чутливою та зручною моделлю для ентеровірусів, які показують високі титри у цій культурі клітин.

ВИСНОВКИ

Адаптація ентеровірусу свиней до культури клітин ВНК-21 сприяє незначному підвищенню інфекційних властивостей патогену протягом 96 годин. При дослідженні динаміки змін інфекційних властивостей ентеровірусів свиней виявлено, що на 96 годину титр вірусу є найвищим.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Калініна О. С. Ветеринарна вірусологія / Калініна О. С., Панікар І. В., Скибіцький В. Г. – К.: Вища освіта, 2004. – 431 с.
2. Демина А. В. Энтеровирусные инфекции: многообразие клинических проявлений / А. В. Демина, С. В. Нетесов. – Новосибирск: 2009. – 10 с.
3. Рахманин П. П. Методические указания по применению перевиваемых клеточных культур для диагностики вирусных заболеваний сельскохозяйственных животных / П. П. Рахманин. – М.: 1988. – 12 с.
4. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За ред. В. П. Широкобокова. – Вінниця: Нова книга, 2011. – 952 с.
5. Поліщук В. П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія» / Поліщук В. П., Будзанівська І. Г. Шевченко Т. П. – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.
6. Freshney R. I. Culture of animal cells: A manual of basic technique / R. I. Freshney. – New York: Alan R. Liss, Inc., 1987. – 397 p.
7. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.
8. Колешко О. И. Микробиология с основами вирусологии / О. И. Колешко, Т. В. Заверзенова. – Иркутск: 1999. – 452 с.
9. Павлій Р. Б. Антибактеріальна та противірусна дія препаратів, сконструйованих на основі похідних флуорену : автореф. дис. На здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Р. Б. Павлій. – Х., 2010. – 23 с.
10. Глотов А. Г. Изучение антивирусных свойств препаратов различного происхождения в отношении герпес- и плевтивирусов крупного рогатого скота / [А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, А. А. Сергеев и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49., № 6. – С. 6–9.

11. Противовирусная активность *in vitro* лекарственных препаратов в отношении возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом / [Логонова С. Я., Борисович С. В., Ковальчук А. В. и др.] // Вопр. вирусологии. – 2007. – № 4. – С. 34–36.
12. Ишков Ю. В. Порфирины и их производные / Ишков Ю. В., Жилина З. И., Водзинский С. В. // Журн. орг. химии. – 2000. – т. 36, вып. 4. – С. 609–612.
13. Клестова З. С. Дослідження цитотоксичної дії похідних порфіринів у перещеплювальних культурах клітин тварин / З. С. Клестова, О. С. Зоз // Ветеринарна біотехнологія. – 2009. – № 14. – С. 20–25.
14. Pallansch M. A. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses / M. A. Pallansch, R. P. Roos // Fields' Virology / Ed. Knipe D. N., Howley P. M. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. – P. 723–775.
15. Амвросьева Т. В. Инструкция по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций / Амвросьева Т. В., Поклонская Н. В., Кишкурно Е. П. – Минск: ГУ РНМБ, 2005. – 28 с.
16. Цыренов В. Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных / Цыренов В. Ж. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 48 с.
17. Юрков С. Г. Каталог коллекции клеточных культур ВНИИВВиМ / Юрков С. Г., Зуев В.В. – Покров: 2000. – С. 59–63.
18. Калініна О. С. Ветеринарна вірусологія / Калініна О. С., Панікар І. В., Скрибіцький В. Г. – К.: Вища освіта, 2004. – 431 с.
19. Деркач І. М. Генетичні властивості ентеровірусів свиней та їх кореляція із серетиповою належністю / Ірина Михайлівна Деркач. – К., 2009. – 22 с.
20. Деркач І. М. Порівняльна характеристика польових штамів ентеровірусів свиней / Деркач І. М., Романенко В. П., Білоштан В. Б. // Науково-технічний бюлетень – 2009. – Вип. 10, № 1/2. – С. 263–269.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОПАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ЭНТЕРОВИРУСОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21**

З. С. КЛЕСТОВА¹, Е. М. ПОПОВА², Г. А. ЛАДИСЮК²

¹Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, г. Киев

²Национальный авиационный университет, г. Киев

Описаны опасность вирусных заболеваний, а именно болезней, вызванных энтеровирусами. Дана характеристика культуры клеток как биологической модели для определения инфекционной активности вирусов, и приведены ее преимущества среди других биологических моделей.

Ключевые слова: культура клеток, вирусы, патогенез, цитопатическое действие, инфекционная активность.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF ENTEROVIRUS CYTOPATHIC EFFECT
INTO CELL CULTURES BHK-21**

Z. S. KLESTOVA¹, E. M. POPOVA², H. A. LADISYUK²

¹State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms, Kyiv

²National Aviation University, Kyiv

Describe the dangers of of virus diseases, such as diseases that are caused by enteroviruses. The characteristic of the cell culture as a biological model for determining the activity of infectious virus, and its advantages are among the of other biological models.

Key words: cell culture, viruses, pathogenesis, cytopathic effect, infectious activity.