

УДК 581.143:533.9

З. С. КЛЕСТОВА, доктор ветеринарних наук
В. І. БЛОКОНЬ, кандидат ветеринарних наук
І. В. САВІНОВА, О. М. МЕЛЬНИЧЕНКО
В. С. ТАШУТА, Ю. Ю. ДРЕМУХ, аспіранти
Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ПІДГОТУВАННЯ ЧУТЛИВИХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ І ХОЛОДНОКРОВНИХ ТВАРИН – ОДИН ІЗ ШЛЯХІВ ЯКІСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Наведені результати з отримання клітин холоднокровних тварин (рептилій) та застосування перещеплюваних культур клітин тварин для потреб ветеринарної вірусології.

Ключові слова: первинні, перещеплювані культури клітин, віруси, холоднокровні тварини.

Бурхливий розвиток багатьох напрямків біологічної науки і важливі сучасні досягнення завдячують застосуванню культур клітин *in vitro*. Сьогодні їх використовують і для генноінженерних досліджень, а також при отриманні нових сортів і властивостей рослин, у медицині і у біотехнологічній та фармацевтичній промисловостях та інших галузях. Але особливу, революційну роль, відкриття вирощування культур клітин *in vitro* зіграло для розвитку вірусології.

Ідея культивування тканин *in vitro* належить професору Харківського університету І.П. Скворцову (1886 р.). Він вирощував культури клітин крові жаби, птахів і людини впродовж декількох місяців, додаючи до культур свіже живильне середовище (1% розчин лібіхівського екстракту). Паралельно цими питаннями займалися дослідники і в інших країнах (Німеччина, США), але широкого розвитку дослідження не мали.

У 1910 р. вчені Берроуз і Каррель [1-3] провели цілу серію дослідів з культивування різних тканин тварин (серце, шкіра, нерви) і показали, що із первинної культури можна отримати методом пересівання другу генерацію клітин, а із другої третю і т.д. Вони розробили метод вирощування тканин в плоских посудинах, форма яких забезпечувала стерильність і умови для інтенсивного і тривалого росту культур. Великого значення мала розробка методу трипсинізації тканин.

У 20-30 роках ХХ ст. ряд вчених СРСР і інших країн світу випробовували культури клітин для виділення і культивування різних вірусів (вітряної віспи, кіру, герпесу, грипу). Але, не дивлячись на успішні досліді з вирощування тканин поза організмом, цей метод знайшов широке застосування після 40-х років, коли були відкриті антибіотики, що дало можливість надійно боротися з бактерійною інфекцією культур клітин і дозволило застосувати його в різних областях експериментальної біології [4-8].

Тепер навіть важко уявити сучасну вірусологію без застосування культур клітин. Культура клітин особливо зручна для роботи в тих випадках, коли задачі

дослідження потребують синхронної, однорідної популяції клітин, короткочасного впливу інгібіторів різних метаболічних шляхів і т. ін. Звісно, що робота з клітинами, які ростуть поза організмом, потребує певних навиків, спеціального обладнання і досить дорогих реактивів і середовищ.

Однією із переваг застосування культур клітин для дослідників є можливість спостерігати за живими клітинами, цілісним моношаром, особливо важливо для вірусологів при виділенні, культивуванні вірусів, при вивченні взаємодії між клітиною і вірусом, який викликає специфічну цитопатичну дію. Крім того, головним напрямком використання культур клітин є тестування і дослідження механізмів дії різних речовин, які можуть бути використані в якості лікувальних препаратів, детергентів, косметичних засобів, інсектицидів, консервантів і т. ін.

Клітини, отримані від тварин, що підтримуються в культурі, називаються первинними до тих пір, доки вони не будуть субкультивовані. Первинні культури клітин диплоїдні. Клітини можуть зберігати багато характерних особливостей вихідного експлантата. Така культура є клітинною лінією. В ній можуть бути присутні декілька різних сортів клітин і деякі особливості клітин можуть виявитись нестабільними. Клітини можливо клонувати, причому деякі клони можуть володіти стабільним фенотипом. Раніше вважали, що при підтримці соматичних клітин в культурі при підходящих умовах вони можуть ділитись протягом необмежено довгого періоду часу, зберігаючи немодифіковану форму. Однак, це виявилось не так.

Вважається, що приблизно 50 генерацій клітини первинної культури експоненціально розмножуються, а потім швидкість росту культури знижується, клітини дегенерують і гинуть. Слід мати на увазі, що 50 генерацій характерні для первинних культур, отриманих з ембріональних тканин, а клітини, отримані із тканин дорослого організму переживають приблизно 20 генерацій при культивуванні *in vitro*. Клітинні штами володіють специфічними властивостями, які зберігаються протягом тривалого культивування. Багато стабільних клітинних штамів здатні до невизначено тривалого росту і розмноження в культурі, причому, як правило, це пов'язано з анеуплоїдним каріотипом. Може бути і інша причина появи в первинних культурах "трансформованих" клітин, що відрізняються за морфологією і каріотипом. Культури первинних клітин можуть бути "зараженими" клітинами інших ліній, які ведуться в тих же лабораторіях.

Трансформовані клітини на відміну від нетрансформованих продовжують рости до виснаження ростового середовища, і якщо не замінити його підтримуючим середовищем, то клітини швидко гинуть.

У порівнянні з дослідженнями на тваринах реальні переваги мають культури клітин, і ставлять їх як експериментальну модель в один ряд з культурами мікроорганізмів. Культури клітин зняли багато етичних проблем, які виникали при використанні людей (добровольців) та тварин в експериментах.

Було опубліковано багато робіт, присвячених культурам клітин. Прикладом можуть слугувати роботи Адамса Р. (1983), Перта С. Дж. (1978), Стріта (1977) та ін.

Застосування культур клітин у вірусологічній практиці ветеринарних лабораторій дозволяє проводити успішну роботу з виділення вірусів і діагностики вірусних інфекцій. Це особливо стосується застосування первинно-трипсинізованих культур клітин [8], зважаючи на їх доступність і високу чутливість до вірусів, особливо до польових ізолятів. В зв'язку з тим, що в інфекційній патології тварин значне місце займають вірусні захворювання, важливим завданням є розширення, для отримання культур клітин, діапазону тканин тваринного походження.

Первинні культури клітин використовують для виділення вірусів-збудників захворювань тварин, а також для накопичення значної вірусної маси та виготовлення вакцин і діагностичних препаратів. Тому, дуже важливим завданням успішної роботи вірусологічних лабораторій є наявність культур клітин.

Метою дослідження було отримання як нових чутливих моделей для виявлення вірусів тварин, так і культивування тваринних клітин для проведення досліджень з виявлення протівірусних властивостей хімічних сполук.

Матеріали і методи. *Середовища:* DMEM, 199 (Біо-Тест-Лабораторія). *Сироватки:* ВРХ(Біо-Тест-Лабораторія), ембріональна теляча (РАА). *Розчини для зняття культури клітин зі скла чи пластику:* розчин версену 0,02%, розчин трипсину 0,25% (Біо-Тест-Лабораторія).

Поживні середовища, сольові розчини і сироватки, які використовували для культивування клітин були стерильними. Перед використанням сироватку прогрівали при температурі 56°C протягом 1 години.

Тварини: Єменський хамелеон (*Chamaeleo calyptratus*), ящірка прутка (*Lacerta agilis*), черепаха середньоазійська (*Testudo (Agrionemys) horsfieldii*).

Культури клітин: перещеплювані культури клітин: СНЕВ (свиняча нирка ембріональна версенна лінія), ВНК-21 (нирка новонародженого сірійського хом'яка), SK-6 (нирка свині), отримані з колекції «Банк культур клітин» Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології НАН України ім. Р.Є. Кавецького.

Вирощували культури клітин безцентрифужним способом, знімаючи їх із скла 0,02 % розчином версену з піпетуванням відшарованих клітин у сироватковому середовищі. Коефіцієнт пересіву складав 1:2, 1:3, 1:4. Отримували якісну культуру клітин, що характеризувалась утворенням суцільного моношару світлих, без зернистості клітин під мікроскопом, щільно прилягаючих одна до одної, без вільних місць і проміжкових просторів. Період культивування складав від 48 до 96 годин. Посівна доза для флаконів ємністю 50 см³ складала 200 тисяч клітин/см³.

Для підрахунку кількості клітин у суспензії їх фарбували 0,5 %-м водним розчином трипанового синього та підраховували кількість клітин у камері Горяєва.

Повноцінна популяція клітин може бути отримана тільки від генерації, яка складається із життєздатних клітин. Тому перегляд і оцінка якості моношару мала вирішальне значення при виборі культур для пересіву. При гарному стані культури між клітинами чітко різнились межі, самі клітини мали типову для даної клітини морфологію. Наявність в полях зору під мікроскопом великої кількості округлених клітинних елементів, порушення морфологічної характеристики даної культури, поява клітин з вакуолями, включеннями та іншими ознаками патології робили дану генерацію непридатною для послідовних пасажів і такі культуральні флакони вибраковували. Для прийняття рішення про якість популяції промивали клітинний моношар буферним розчином, який використовують для ополіскування тканин (розчин Хенксу) чи ростове середовище.

Проводили контроль на відсутність контамінації мікоплазмами. Паралельно із висівом в напіврідкий агар, проби ростового середовища висівали на різні поживні середовища, які застосовують для бактеріо-логічного контролю (МПА, МПБ, агар Сабуро, цукровий бульйон, бульйон Хоттінгера). Посіви витримували протягом 8 діб за 37 ° С, а на середовищі Сабуро – за кімнатної температури (20-22° С) – протягом 15 днів.

Результати досліджень та обговорення. Оскільки відомо, що холодно-кровні тварини можуть бути переносниками або резервуарами особливо небезпечних вірусних інфекцій не тільки тварин, а і людей (наприклад, жовтої лихоманки, лихоманки Західного Нілу, лихоманки Денге, Чикунгун'я та ін.), тому сьогодення ставить нові питання перед сучасною вірусологією щодо виділення їх етіологічних чинників, в тому числі і виділення вірусів від рептилій. Дослідження вірусів рептилій – порівняно новий напрямок науки, що почав швидко розвиватись упродовж кількох останніх десятиріч. Але для виділення і дослідження властивостей цих вірусів необхідна чутлива система культивування. Такою системою можуть бути клітини холоднокровних тварин, а саме культури клітин різного походження, отриманих від різних видів холоднокровних тварин та з їх різних органів [10-14].

Тому, нами відпрацьовувались методи отримання первинної культури клітин холоднокровних тварин (рептилій), що здійснено вперше в Україні в Інституті ветеринарної медицини НААН. Отримання клітин в культурі від холоднокровних тварин є особливо важким завданням із-за специфічного метаболізму цих клітин, які кардинально відрізняються від клітин теплокровних тварин не тільки за різними температурними та іншими параметрами їх вирощування, а і за особливостями будови деяких структурних елементів клітин, а також за їх біохімічними особливостями [15,16].

Для поставленої мети, нами використано в дослідах наступних тварин:

1. Єменського хамелеона (*Chamaeleo calytratus*) віком 2,5 місяця (на момент проведення досліджень тварина була клінічно здорова, добре вгодована, отримана з господарства (приватного розплідника). 2. Ящірки пруткої (*Lacerta agilis*), що мешкають у природних популяціях передмістя Києва, являючись аборигенними видами даної місцевості). 3. Черепахи середньоазійської (*Testudo (Agrionemys) horsfieldii*).

Клітинну суспензію з органів цих тварин отримували методом холодової трипсинізації. Відпрацьовувався температурний режим культивування клітин (28 °C, 29°C, 30°C, 35°C, 37 °C) та оптимальний склад культурального середовища.

Встановлено, що при культивуванні клітин Єменського хамелеона (отриманих з ниркової тканини) за температури 28°C, через 4 доби спостерігали початок ділення клітин. Заміну ростового середовища проводили кожні 3 дні, додаючи різні концентрації ембріональної сироватки теляти (від 10 % до 20 %). Через 10 діб спостерігали утворення неповного моношару клітин, які за зовнішнім виглядом нагадували видовжені веретеноподібні клітини (на даний момент ми не знайшли аналогів за зовнішнім виглядом клітин у доступній зарубіжній науковій літературі) [8]. Клітини у культурі при неповному виповненні моношару прожили 29 діб, після чого з невідомих причин загинули. Первинна культура клітин, отримана з нирок та тестикул ящірок прутких пережила при 28°C 16 діб.

На даний момент з отриманих первинних культур клітин холоднокровних тварин культивуються: 1). З ящірки прудкої – клітини серця, легень, нирок, яєчників, тестикулів; 2). З черепахи середньоазійської – клітини серця, легень, нирок. Усі клітини вирощуються в умовах температур при 37 °C , при 35 °C та при 29 °C. При 37°C в культуральному посуді на 2-3 місяць утворився виповнений моношар

клітин. Клітини дуже дрібні, фібробластоподібні. При 29 °С – наявні лише острівці великих за розміром веретеноподібних клітин.

Первинні культури клітин для отримання субкультур пересівали у співвідношенні 1:2; 1:3; залежно від густини моношару клітин, що визначали мікроскопією під малим збільшенням ($\times 10 \times 20$).

Субкультури клітин отримували шляхом трипсинізації моношару первинних культур клітин версен-трипсиною сумішшю (співвідношення розчину трипсину 0,25% до розчину Версену 0,02% 1:3), час експозиції 12-17 % вилин за температури +37°C до відшарування клітин моношару від скла. Потім у культуральний посуд вносили ростове середовище з додаванням 10 %- ї підготовленої сироватки крові ВРХ (чи ембріональної сироватки крові телят) з рН 7,2–7,4. Субкультури клітин вирощували до утворення суцільного моношару протягом при + 37°C без зміни поживного середовища.

Таким чином, нами відпрацьована методика отримання культур клітин холонокровних тварин, що може слугувати для подальших досліджень з виділення вірусів – збудників особливо небезпечних інфекцій як тварин, так і людей.

Крім того, для проведення цитотоксичних та вірусологічних досліджень обрали та культивували і інші біологічні системи: перещеплювані клітинні лінії тваринного походження: СНЕВ, ВНК-21, SK-6. За оптимальних параметрів культивування зроблено 51 пасаж культури клітин ВНК-21 та 53 пасажі культури клітин СНЕВ, 6 пасажів клітин SK-6. Ці культури клітин активно використовуємо для проведення доклінічних досліджень в умовах *in vitro* при тестуванні різних хімічних речовин, які в подальшому можуть стати основою лікарських засобів. Визначаємо їх цитотоксичну дію, інші властивості, серед яких і противірусні здатності. Для проведення повного комплексу з виявлення противірусних властивостей речовин в системі *in vitro* нами проводяться і дослідження щодо інгібуючих інфекційну активність вірусів властивостей хімічних сполук та фармакологічних лікарських засобів, які використовують в гуманній медицині, але не досліджені і не використовують у ветеринарній медицині, результати цих досліджень опубліковувались раніше.

Противірусну активність сполук перевіряємо на різних моделях вірусів, а саме, щодо ДНК-вміщуючих вірусів (серед яких герпесвірус хвороби Ауескі, вірус ринопневмонії коней першого типу) та РНК-вміщуючих вірусів (коронавірусу, ротавірусу, ентеровірусів свиней та ін.). Для цього, готуємо вірусний матеріал, який слугує моделлю для проведення доклінічних досліджень з виявлення противірусної дії тестованих сполук. У перещеплювальних клітинних лініях проводимо пасажування вірусів, які викликають цитопатичу дію, та визначаємо їх титри інфекційної активності. При цьому, досягаємо високих значень титрів для подальших досліджень противірусних властивостей хімічних сполук. В даний час визначаємо в культурах клітин властивості таких хімічних сполук, як нові синтезовані похідні індолу.

Таким чином, створена система щодо доклінічного скринінгу хімічних сполук в системі *in vitro* для виявлення перспективних речовин з противірусною дією.

Висновки. Отримані нові культури клітин тварин, а саме холонокровних, які можливо використовувати для виділення вірусів, збудників особливо небез-

печних хвороб тварин та людини. Налагоджена система контролю та тестування нових лікарських засобів та різних сполук для вивчення їх впливу на біологічні об'єкти, що дозволяє вивчати механізми їх дії.

Список використаної літератури

1. *Carrel A.* Cultivation of tissues in vitro and its technique / Carrel A., Burrow M. T. // *J. Exp. Med.* – 1911. – 13. – P. 387-396.
2. *Carrel A.* An addition to the technique of the cultivation of tissues in vitro/ A. Carrel., M. T. Burrow // *J. Exp. Med.* – 1911. – 14. – P. 244 – 247.
3. *Carrel A.* On the permanent life of tissues outside of the organism / A. Carrel // *J. Exp. Med.* – 1912. – 15. – P. 516 – 528.
4. *Kuchler R.* Growth of tissue cells in suspension / R. Kuchler, D. Merchant // *University of Michigan Medical Bulletin.* – 1958. – Vol. 24. – P. 200-212.
5. *Witkowski J. A.* Experimental pathology and the origins of tissue culture: Leo Loeb's contribution / A. Witkowski // *Medical History.* – 1983. – 27. – P. 269-288.
6. Метод культур клеток и разработка аспектов его применения в практике медицинской службы армии и флота. Военная медицина. Проблемы профилактики, диагностики, лечения экстремальных ситуаций: Материалы научн. конф. М. – 1994. – С. 229-225.
7. *McLimans W. F.* The submerged culture of mammalian cells: The spinner culture / W. F. McLimans et al // *J. Immunology.* – 1957. – Vol. 79. – P. 428-433.
8. *R. IAN Freshney.* Culture of Animal Cells. A manual of basic technique / R. IAN Freshney // *Wiley-Liss.* – 2005. – 642 p.
9. *Van Wezel A. L.* Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture / A. L. Van Wezel // *Nature* – 1967. Vol. – P. 216-264.
10. *Goldstein S.* Growth of cultured cells from the Galapagos tortoise / Goldstein S. // *Exp. Cell Res.* – 1974. – 83. – P. 279-302.
11. *Rund C.R.* In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: comments on melanomacrophage morphology / Rund C.R., Christiansen J.L., Johnson. J.C // *Pigment Cell Res.* – 1998. – 11. – P. 114-119.
12. *Simpson S. B.* Cells from the lizard *Anolis* do not exhibit senescence / S. B. Simpson, D.M. Rausch // *Gerontologist, Special Issue.* – 1989. – P. 29- 284.
13. *L. Rao R.* Cytogenetic Characterization and Fluorescence in situ Hybridization of (GATA)10 Repeats on Established Primary Cell Cultures from Indian Water Snake (*Natrix piscator*) and Indian Mugger (*Crocodylus palustris*) Embryos/ L. Rao R. Turlapati M., Patel, et al. // *Cytogenetic and Genome Research.* – 2009. – V. 127. – N. 2-4. – P. 287-296.
14. *Pan-Chen Liu1.* Establishment of a soft shell turtle, *Pelodiscus sinensis*, embryo primary cell culture for studies of soft shell turtle poxvirus-like virus replication and characteristics/ Chi-Young Wang1, Shiun-Long Lin1 et al. // *African J. Microb. Res.* – 2012. – V. 6(5). – P. 960-967.
15. *N. G. Stephenson.* Effects of temperature on reptilian and other cells/ N. G. Stephenson // *Embryol. exp. Morph.* – 1966. – V. 16(3). P. 455-467.
16. Low temperature storage of surface attached living cell cultures // Patent N 3303662. (Patents Published on 03/16/1976).

ПОДГОТОВКА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ХОЛОДНОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ – ОДИН ИЗ ПУТЕЙ КАЧЕСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ / З.С. Клестова, В.И. Билоконь, И.В. Савинова, А.М. Мельниченко, В.С. Ташута, Ю.Ю. Дремух

Приведены результаты по получению клеток холоднокровных животных (рептилий) и применения перевиваемых культур клеток животных для нужд ветеринарной вирусологии.

Ключевые слова: первичные, перевиваемые культуры клеток, вирусы, холоднокровные животные.

PREPARATION OF SENSITIVE MODELS FOR ISOLATION OF VIRAL DISEASES AGENTS OF AGRICULTURAL AND COLD-BLOODED ANIMALS – ONE OF THE WAYS OF QUALITATIVE RESEARCH / Z.S. Klestova, V.I. Bilokon, I.V. Savinova, A.M. Melnichenko, V.S. Tashuta, Y.Y. Dremuch

The results on the preparation of cold-blooded animals (reptiles) cells and the use of continuous animal cell cultures for the needs of veterinary virology are presented.

Keywords: primary, continuous cell cultures, viruses, cold-blooded animals.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **И. М. Полупан**