

УДК 619:578

З.С. КЛЕСТОВА, докт. вет. наук, заступник директора
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ
І.В. САВІНОВА, аспірант
Інститут ветеринарної медицини НААН, Київ

НОВІ БІОЛОГІЧНІ СИСТЕМИ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ХОЛОДНОКРОВНИХ ТВАРИН

*Наведено дані щодо особливостей культивування клітинних ліній, отриманих від кількох видів холоднокровних хребетних тварин, а саме жаби шпоркової гладенької (*Xenopus laevis*), ящірки прудкої (*Lacerta agilis*) та черепахи середньоазійської (*Testudo horsfieldii*). Надано рекомендації щодо вибору оптимальних живильних середовищ і температури культивування клітинних ліній від тварин різних класів.*

Вірусні інфекції займають провідне місце в інфекційній патології. Попри значні успіхи у вакцинопрофілактиці, повністю позбутися інфекційних захворювань не вдається. На фоні вже відомих вірусних інфекцій виникають нові. Частина їх належить до емерджентних, резервуарами патогенів яких у 75% випадків є тварини дикої фауни [29]. Але якщо дослідженню теплокровних тварин присвячено численні наукові праці, то з вивченням холоднокровних зовсім інша справа.

Дослідження вірусів амфібій і рептилій – порівняно новий напрям у науці, який почав швидко розвиватись упродовж кількох останніх десятиліть. Значна увага приділяється захворюванням, які спричиняють епізоотії серед холоднокровних тварин і пов'язані з цим економічні збитки. Особливо це стосується тварин в аквакультури. Вірусні патогени з родин іридо-, герпес- та поліомавірусів також можуть викликати епізоотії серед представників дикої фауни, призводячи до зниження кількості зникаючих і рідкісних видів амфібій і рептилій [14]. Іншим напрямом цих досліджень є вивчення ролі пойкилотермних хребетних у поширенні вірусів, які становлять небезпеку для теплокровних тварин і людини. Представники цих класів тварин можуть бути проміжними хазяями або

резервуарами збудників найрізноманітніших захворювань, у т. ч. вірусів із родин тога-, адено-, герпес- та флавівірусів. Рептилії та амфібії схильні до безсимптомного носійства упродовж сплячки арбовірусних інфекцій й саме тому відіграють значну роль у підтриманні резервуарів збудників трансмісивних захворювань у природі [6, 8, 13, 16, 17, 28].

Багато досліджень свідчать, що арбовіруси мають величезний патогенний потенціал. В останні 20–30 років під впливом демографічних, соціально-економічних і екологічних факторів склались унікальні умови, які сприяли посиленню епідемічного потенціалу низки арбовірусів (жовтої лихоманки, Західного Нілу, лихоманки денге, чикунгунья), а також їх поширенню на території, де вони раніше не траплялись і де викликають інтенсивні епідемії [1].

Одна з найважливіших умов збереження природно-вогнищевих захворювань – наявність резервуарних хазяїв, здатних забезпечувати тривале існування збудника на певній території. Холоднокровні хребетні мають потенційне значення як хазяї збудників небезпечних арбовірусних захворювань, серед яких віруси енцефаломієлітів коней (східного – Eastern equine encephalomyelitis та західного – Western equine encephalomyelitis), віруси японського енцефаліту (Japanese encephalitis virus), а також лихоманки Західного Нілу (West Nile virus). В окремих районах США [13, 15, 16, 25, 26] та Канади [7, 9, 10] було відловлено рептилій, заражених вірусами західного й східного енцефаломієліту коней. Як при природному, так і експериментальному зараженні цикли віремії у цих тварин спостерігались упродовж багатьох місяців. Інфекція мала інанпаратний перебіг, а ступінь віремії залежав від температурних умов. При зниженні температури (настанні сплячки) титри вірусу в крові досліджуваних тварин падають, але з її підвищенням рівень віремії стає досить високим для зараження членистоногих переносників. Найбільше значення в передачі арбовірусів мають комарі родів *Aedes*, *Culex*,



© З.С. Клестова, І.В. Савінова, 2015



Naemagogus [5]. Певні види комах (*Cx. peccator* і *Ur. sapphirina*), які живляться як на рептиліях і амфібіях, так і на теплокровних тваринах, є проміжними хазяями арбовірусів і ланкою в ланцюгу поширення вірусів енцефаломієлітів [13].

Перші повідомлення про випадки масового захворювання рептилій на лихоманку Західного Нілу з'явилися у 2001 р. Захворювання було зареєстровано серед алігаторів на крокодилячих фермах у штаті Флорида, наступного року – на фермах у штаті Джорджія, а також на фермі нільських крокодилів в Ізраїлі та серед крокодилів у Мексиці [2, 18]. До 2005 р. захворювання зареєстрували у штатах Техас, Луїзіана та Айдахо. У Луїзіані загинуло 5000 молодих алігаторів, було зафіксовано 4 випадки зараження персоналу ферм [21]. Серед диких алігаторів в епізоотичних вогнищах виявили серопозитивних особин. Для крокодилових вірусів Західного Нілу є типовою емерджентною інфекцією і, ймовірно, пов'язаний з інтродукцією одного штаму вірусу, патогенного для людини, птахів і коней. Згідно з деякими даними в алігаторів, які захворіли, відзначено високий ступінь віремії та, ймовірно, значне виділення вірусу. Виходячи з

даних щодо характеру епізоотичних спалахів, передбачається, що збудник може поширю-

ватись серед чутливих видів крокодилів не лише трансмісивно, а й іншими шляхами. Нещодавно було повідомлено про парентеральну й оральну інюкуляцію вірусу в експериментальній групі алігаторів [20]. Ці дані свідчать про потенційну небезпеку зараження людей, які безпосередньо контактують із фекаліями й тканинами тварин [2].

Вивчення взаємодії клітинних ліній холоднокровних зі збудниками лихоманки Ебола та Ласса виявило сприйнятливість деяких із них до цих вірусів [27], а пермісивність кількох клітинних ліній рептилій до вірусу сказу було засвідчено ще в 1972 р. [12].

Отже, не викликає сумніву той факт, що холоднокровні хребетні тварини (амфібії та рептилії) можуть бути резервуарами й переносниками збудників багатьох інфекційних хвороб, а їх подальше вивчення є перспективним і важливим напрямом у збереженні біобезпеки держави.

Незважаючи на те, що окремі дослідження в цьому напрямі ведуться в різних

країнах, їх результати й досі нечисленні й досить розрізнені. Відсутність комерційного та наукового інтересу пов'язана з тим, що цих тварин не вирощують у промислових масштабах, як представників інших класів. Унаслідок цього кількість досліджень, пов'язаних із вивченням інфекційних захворювань рептилій, донедавна була дуже незначною. Попри те, що питанню вірусних хвороб тварин цього класу стало приділятися більше уваги після включення Робочою групою МЕБ з питань захворювання диких тварин фібропапіломатозу морських черепах (*Infection with fibropapillomatosis in sea turtles*) та папіломатозу крокодилів (*Infection with Crocodilepox virus (Papillomatosis in crocodiles)*) до списку захворювань, «які необхідно контролювати, враховуючи їх важливість для диких тварин, а також з метою захисту тваринництва та здоров'я людей», кількість досліджень із цього напрямку є дуже обмеженою [30].



Окрім того, слід зазначити, що такі поширені серед рептилій вірусні інфекційні захворювання, як герпесвірусна інфекція черепах (*Testudo herpes virus*, (THV)), параміксовіроз змії (*Ophidian paramiksovirus* (OPMV)) та «хвороба тілець-включень» (*Inclusion body disease* (IBD)), яка уражує удавів і пітонів, є предметом дискусій ветеринарних герпетологів усього світу, оскільки спалахи цих захворювань супроводжуються високою летальністю і призводять до руйнівних наслідків для герпетологічних колекцій і значних економічних втрат на комерційних фермах, де утримують таких тварин.

І навпаки, в останні кілька років зріс інтерес до амфібій не лише через різке зниження їх кількості внаслідок руйнування природних місць проживання, а також через раптові спалахи таких висококонтагіозних захворювань, як хитридіомікоз (*Infection with Batrachochytrium dendrobatidis*) та ранавірусна інфекція (*Infection with ranavirus*), які є причиною високої летальності серед цих тварин не лише на промислових фермах і в зоологічних колекціях, але й у нечисленних популяціях рідкісних і зникаючих видів у природі. Ось чому з 2009 р. ці захворювання внесено до Списку МЕБ (OIE Listed diseases).

Питання діагностики, лікування й профілактики цих захворювань набувають щодамі більшого значення не лише при утриманні рептилій і амфібій як об'єктів зоокультури, реалізації програм зі збереження й реінтродукції рідкісних видів, а також при регуляції торгівлі, транспортуванні і встановленні ветеринарних норм для цієї групи тварин. Отже, одним з найважливіших є питання попередження поширення інфекційних вірусних хвороб пойкилотермних тварин, оскільки обсяги торгівлі екзотичними тваринами щороку зростають.

Нові емерджентні інфекції становлять серйозну потенційну загрозу не лише для штучно створених, але й природних популяцій рептилій і амфібій. Відловлені в дикій природі тварини після потрапляння в неволю опиня-

ються в оточенні нових патогенів. Стрес під час транспортування й неадекватні умови утримання призводять до значного зниження імунітету, що робить їх більш сприйнятливими до інфекцій, а спільне утримання тварин, завезених із різних регіонів, сприяє поширенню інфекційних агентів серед нових хазяїв [22]. Збудники хвороб можуть еволюціонувати й інфікувати нових хазяїв. А враховуючи низький рівень культури населення щодо утримання екзотичних тварин, існує реальна загроза потрапляння нових патогенів у довкілля. Сукупність цих факторів може призвести до поширення збудників небезпечних хвороб серед сприйнятливих тварин і людей, а також мати катастрофічні наслідки для місцевої герпетофауни.

Україна, на жаль не приділяє належної уваги цим питанням, попри те, що в країні в останні роки екзотичні улюбленці дедалі частіше стають пацієнтами ветлікарів. Поки що не ведеться вірусологічна діагностика хвороб рептилій, відсутня також законодавча база з регулювання й контролю цього питання. Згідно з ветеринарними нормами України для цієї категорії тварин передбачено лише бактеріологічне дослідження на наявність сальмонел і 30-добовий карантин. Але цього недостатньо для виявлення найбільш поширених серед холоднокровних тварин вірусних інфекцій. Тому існує гостра потреба в розробленні ветеринарних заходів, спрямованих на ранню діагностику, яка включатиме карантинні заходи, скринінгові дослідження щойно імпортованих чи відловлених тварин, а також створення ефективних лікувальних засобів.

Згідно з настановою МЕБ Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2012) культура клітин є «золотим стандартом», коли йдеться про діагностику інфекцій амфібій, викликаних збудниками роду *Ranavirus*. І попри те, що кілька вірусів цієї групи можуть бути виділені на деяких перещеплювальних лініях риб, клітинні лінії амфібій є більш чутливими і їх використання прийнятніше.

У таких найбільших світових клітинних банках, як ECACC, ATCC, DSMZ, і кількох колекціях клітинних культур інститутів міжнародного значення, які налічують десятки тисяч найрізноманітніших клітинних культур, на цей час зберігається дуже обмежена кількість клітинних ліній амфібій і рептилій. Більшість із них була отримана в середині минулого століття [24]. Однак, попри вже існуючі клітинні лінії жаб, вони не завжди можуть задовольнити зрілі потреби дослідників. Українські колекції та банки клітинних культур не містять не лише жодної вітчизняної клітинної лінії від амфібій, а навіть штамів із міжнародних колекцій. Окрім того, для вітчизняних лабораторій не завжди можливе й економічно виправдане придбання зарубіжних клітинних ліній. Більше того, їх придбання (як технічно, так і юридично) є дуже проблематичним, а робота з ними пов'язана з певними труднощами при культивуванні й придбанні специфічних і дорогих середовищ. Таким чином, розширення досліджень з отримання культур клітин від амфібій і рептилій, створення вітчизняних перещеплювальних клітинних ліній і винайдення нових пермісивних систем для вивчення морфології, еволюції, екології епізоотичного й антропозоотичного потенціалу вірусів є актуальним напрямом досліджень.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Тварини. Як донорів тканини для отримання первинної культури клітин використали цьоголітків жаби шпоркової гладенької (*Xenopus laevis*) та черепаху середньоазіатську (*Testudo horsfieldii*), придбаних у приватній зооторговельній компанії, а також представника місцевої дикої герпетофауни – ящірку прудку (*Lacerta agilis*) із лісів передмістя Києва.

Живильні середовища, сироватки і розчини. Для досліджень було використано такі живильні середовища: DMEM (SH30243.01; HyClone); RPMI-1640 (R8758; Sigma-Aldrich®); 199 («Біо-ТестЛаб», Україна). Як хелатні агенти й дезагрегуючі розчини було використано: розчини трипсину 0,25%, версену



0,02%, без Ca^{2+} Mg^{2+} («БіоТестЛаб», Україна). Антисептичні, антибактеріальні й фунгіцидні агенти: розчин гентаміцину сульфату 4% («ПАТ «Артеріум», Україна); пеніцилін-стрептоміцин (10 тис. Од./мл пеніциліну і 10 мг/мл стрептоміцину сульфату; розчин для культур клітин; P0781; Sigma Chemical Co., EU); флуконазол 0,2% («Юрія-Фарм», Україна); спирт етиловий 70% (ВФК «Біо-Фарма ЛТД», Україна). Інші розчини та добавки до живильних середовищ: вода стерильна (дистильована) для ін'єкцій (ПАТ «Артеріум», Україна); фетальна сироватка крові ВРХ (FBS) (S7524; Sigma Chemical Co., EU), L-глутамін (D7384; Sigma Chemical Co., EU).

Субстрати. Як субстрат для вирощування клітинних ліній було використано пластикові культуральні флакони з ростовою площею 25 cm^2 виробництва Sarstedt (Germany) і TPP Techno Plastic Products (Switzerland).

Морфологічна оцінка. Для вивчення морфологічних особливостей отриманих клітин мікроскопічно оцінювали нативні препарати за допомогою інвертованого мікроскопа Leica DM IL LED при 10 \times , 20 \times та 40 \times -кратних збільшеннях із застосуванням методу фазового контрасту.

Контроль контамінації. Для контролю контамінації клітинних ліній мікроорганізмами застосовували мікробіологічний і цитологічний методи [3].

Під час роботи з культурами клітин використовували стерильні живильні середовища та розчини з дотриманням усіх вимог [11]. Первинні культури клітин отримали відповідно до Методичних рекомендацій з отримання первинно-трипсинізованих культур клітин холоднокровних тварин [4]. За первинними культурами вели тривале спостереження, у міру зміни рН середовища замінювали його на свіже (раз чи двічі на тиждень). Після досягнення клітинами щільного моношару їх пересівали за загальноприйнятою методикою [11].

Визначення оптимальних параметрів культивування. Для визначення оптимальних умов культивування клітинних субкультур оцінювали

такі параметри: температуру інкубації (23–37°C), кілька типів живильних середовищ і їх комбінації. Критеріями оцінки слугували такі показники, як проліферативна активність клітин (оцінювали за індексом проліферації – ІП) та час утворення моношару. Для обрахування індексу проліферації підраховували у культуральних флаконах живі прикріплені й розпластані клітини в 10 полях зору при стократному збільшенні. Індекс проліферації (X) підраховували за формулою:

$$X = a/b,$$

де a – остаточна кількість клітин/10 полів зору; b – посівна кількість клітин/10 полів зору.

Статистичні методи. Отримані дані обробляли в Microsoft Excel. При цьому визначали середнє арифметичне (M), статистичну помилку середнього арифметичного (m), середнє квадратичне відхилення (δ), показник різниці між середнім арифметичним двох варіаційних рядів за критерієм вірогідності (td) і таблицею Стьюдента. Різницю між двома величинами вважали вірогідною при $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вирощування отриманих субкультур використовували такі повні ростові середовища та їх композиції (ПРС): DMEM; 199; композиція DMEM/199 1:1; RPMI-1640. До всіх типів середовищ і їх комбінацій було додано однаково кількість антибактеріальних і фунгіцидних компонентів – 50 тис. Од. пеніциліну, 50 мг стрептоміцину сульфату, 2,0 мг гентаміцину сульфату, 4,0 мг флуконазолу/100 мл середовища, L-глутаміну 200 мМ/100 мл середовища та FBS 15% за кінцевим об'ємом. Для вирощування клітинної лінії *Xenopus laevis* усі використані живильні середовища були скориговані за осмотичним тиском шляхом додавання 20% дистильованої води від об'єму середовища [19].

Розчином для диспергування слу-

гувала суміш розчинів трипсину та версену в пропорції 3:1. Після приготування всі розчини й середовища були стерилізовані шляхом фільтрації через 0,22 μm фільтр (Millex®-GS), і їх робочі аліквоти зберігалися до використання у стерильному посуді при 4°C у захищеному від світла місці.

Проліферативну активність клітинних культур було досліджено за різних температур інкубації. Для клітин *Xenopus laevis* температурні межі дорівнювали 23–33°C, *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii* – 26–37°C. Для цього суспензію клітин *Xenopus laevis* з посівною концентрацією $\approx 5 \times 10^5$ кл./ cm^3 у ПРС DMEM (скоригованим за осмотичним тиском для клітин амфібій) висівали в культуральні флакони й інкубували за різних температурних режимів – від 23 до 33°C. Культивування за 23°C не приводило до клітинної адгезії й проліферації, більшість клітин залишалися неприкріпленими й знаходилися у суспензії. Окремі клітини, які прикріпилися, не виявляли ознак проліферації навіть через 2 тижні після посіву й через кілька тижнів загинули. За температури інкубації 26°C кількість прикріплених клітин була більшою, ніж за 23°C, і за 18 діб спостерігалось формування нещільного моношару із дуже видовжених фібробластоподібних клітин. За 29°C кількість прикріплених клітин була приблизно така сама, як за 26°C, але клітинний моношар формувався на 4 доби раніше. За морфологією клітини були менш видовжені й мали більш виражені контури (рис. 1).



Рис. 1. Моношар фібробластоподібних клітин *Xenopus laevis* за температури інкубації 26°C ($\times 100$)

Таблиця 1 – Вплив температури інкубації на показники росту субкультур клітин *Xenopus laevis*

Показники	Температура інкубації, °C			
	23	26	29	33
Час формування моношару, дів	–	18	14	–
Індекс проліферації	0,3±0,2	3,6±0,1	4,3±0,1	0,5±0,2

За температури інкубації 33°C фіксували найбільший відсоток прикріплених клітин амфібій і значну їх проліферативну активність упродовж перших трьох дів. Але на 4-ту добу ріст клітин зупинявся і з'являлися ознаки їх дегенерації: вакуолізація цитоплазми, округлення й відокремлення клітин від субстрату. Наприкінці 5-ї доби майже всі клітини знаходились у суспензії. Результати наведено в табл. 1.

Проліферативну активність клітин *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii* досліджували в температурному діапазоні 26–37°C [19]. Суспензію з посівною концентрацією $\approx 6 \times 10^5$ кл./см³ у ПРС DMEM висівали в культуральні флакони й інкубували за різних температурних режимів. Клітинні лінії, отримані від обох видів тварин, демонстрували приблизно однакову динаміку росту в тих самих умовах вирощування. Активний ріст і проліферація спостерігалися в усьому досліджуваному діапазоні температур. При 26 і 29°C відзначали найбільшу кількість прикріплених, розпластаних і активно проліферуючих клітин (рис. 2), але при 26°C утво-

рення моношару було повільнішим і за даної посівної концентрації спостерігалось на 9-ту добу після посіву, а за 29°C – уже наприкінці 4-ї доби фіксували утворення виповненого моношару, який складався з видовжених фібробластоподібних клітин з чітко окресленими краями (рис. 3).

При температурі 33°C було відзначено значну проліферативну активність клітин, моношар був виповненим уже на 3-тю добу інкубації, але значна кількість клітин не була прикріпленою і знаходилась у суспензії. Окрім того, відзначалась швидка деградація моношару на 4–5-ту добу культивування з округленням і відокремленням клітин від субстрату. Вирощування отриманих субкультур рептилій при 37°C не приводило до утворення виповненого моношару, попри високу проліферативну активність клітин, яка відзначалась на 1-шу добу після посіву. За таких температурних умов навіть клітини, які почали ділитися на 3-тю добу культивування, втрачали зв'язок між собою, округлювались і переходили у суспензію. Результати наведено в табл. 2.

Для вивчення впливу живильних ростових середовищ різного складу на ріст культури клітин *Xenopus laevis* клітинну суспензію з посівною концентрацією $\approx 5 \times 10^5$ кл./см³ висівали в культуральні флакони й інкубували за температури 26°C. Використовували різні ПРС (скориговані за осмотичним тиском до необхідного для амфібій) з однаковими концентраціями антибактеріальних, фунгіцидних, ростових компонентів і сироватки.

При застосуванні ПРС DMEM спостерігалась активна проліферація клітин, утворення колоній із клітин, які прикріпилися, збільшення щільності клітинної популяції й утворення на 5-ту добу після посіву острівців зливного росту. Утворення щільного моношару фіксували на 15-ту добу, індекс проліферації становив $5,3 \pm 0,2$. Середовище RPMI-1640 забезпечувало приблизно такі самі результати: утворення моношару було зафіксовано на 18-ту добу після посіву, ІП дорівнював $5,1 \pm 0,1$. При культивуванні отриманих ліній на композиції середовищ 199/DMEM проліферація була значно повільнішою, моношар утворився лише на 35-ту добу, середовище в процесі культивування залужнювалося набагато швидше, ІП дорівнював $6,1 \pm 0,2$. Також слід зазначити, що середовище такого складу стимулювало ріст клітин дещо іншої морфології порівняно з двома попередніми – значно видовжених, «голкоподібних» фібробластоподібних клітин, які формували не-

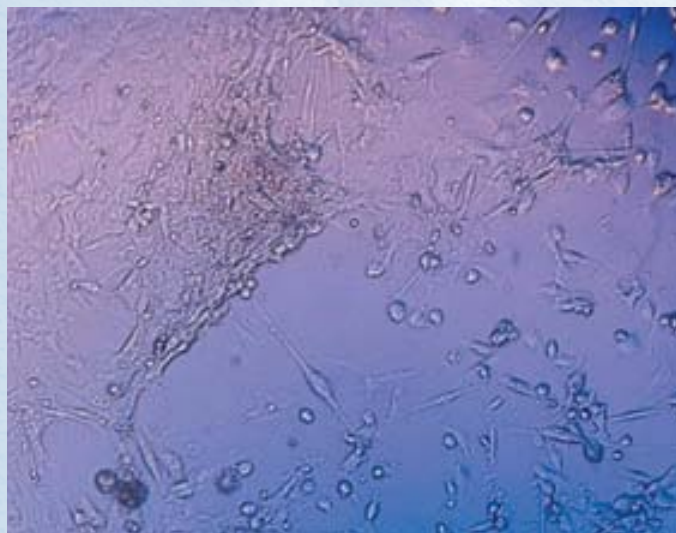


Рис. 2. Проліферація клітин *L. agilis* та утворення острівців зливного росту (×200)

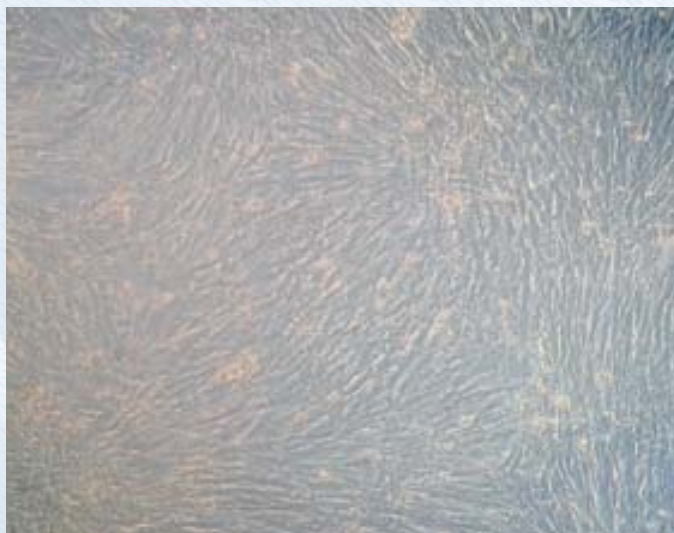


Рис. 3. Виповнений моношар *Testudo horsfieldii* (×100)



Таблиця 2 – Вплив температури інкубації на показники росту субкультур клітин *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii*

Показники	Температура інкубації, °С			
	26	29	33	37
Час формування моношару, дб	9	4	3	–
Індекс проліферації	2,2±0,2	3,1±0,1	3,9±0,1	4,2±0,2

Таблиця 3 – Вплив типу живильного середовища на показники росту субкультур фібробластів *Xenopus laevis*

Показники	Живильне середовище			
	DMEM	DMEM/199 (1:1)	199	RPMI-1640
Час формування моношару, дб	15	35	–	18
Індекс проліферації	5,3±0,2	6,1±0,2	0,2±0,2	5,1±0,1

Таблиця 4 – Вплив типу живильного середовища на показники росту субкультур фібробластів *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii*

Показники	Живильне середовище			
	DMEM	DMEM/199 (1:1)	199	RPMI-1640
Час формування моношару, дб	4	–	–	5
Індекс проліферації	3,9±0,2	1,0±0,2	0,2±0,2	4,1±0,1

щільний моношар зі значними міжклітинними проміжками. Середовище 199 не забезпечувало росту клітин. Навіть на 5-ту добу після посіву прикріплення, розпластування чи проліферації клітин не спостерігали, майже всі вони знаходились у суспензії. Порівняльні дані наведено в табл. 3.

Для визначення оптимального складу живильного середовища для вирощування отриманих клітинних культур рептилій застосовували різні середовища та їх комбінації. Вміст антибактеріальних, фунгіцидних, ростових компонентів і сироватки був сталим для всіх типів живильних середовищ. Посівна концентрація клітин *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii* у цьому досліді становила $\approx 6 \times 10^5$ кл./см³, температура інкубації – 29 °С.

При вирощуванні клітин рептилій із застосуванням ПРС DMEM було відзначено їх значну проліферативну активність, утворення колоній із клітин, які прикріпилися, збільшення щільності клітинної популяції, утворення островців зливного росту вже на 2-гу добу після посіву, виповненого моношару – на 4-ту добу культивування. Дуже схожі результати було зареєстровано при застосуванні ростового середовища

RPMI-1640, але виповнений моношар утворювався на 5-ту добу. При культивуванні отриманих ліній на композиції середовищ DMEM/199 1:1 було відзначено значну кількість прикріплених і активно проліферуючих клітин на 1-шу добу після посіву, але надалі клітинний ріст значно уповільнювався, клітинні островці мали сталий розмір і подальшої міграції клітин із них не відбувалося. Заміна середовища спричиняла незначне підвищення проліферативної активності, але виповнений моношар у таких культуральних флаконах не утворювався. Середовище 199 не забезпечувало росту клітин. Навіть на 5-ту добу після посіву прикріплення, розпластування чи проліферації клітин не спостерігали, майже всі вони знаходились у суспензії. Порівняльні дані наведено в табл. 4.

ВИСНОВКИ

1. Серед холоднокровних тварин циркулюють небезпечні патогени, здатні викликати вірусні хвороби у людей і тварин. Вперше в Україні створено моделі (культури клітин) з холоднокровних хребетних тварин, представників класів амфібій та рептилій, які можна використовувати для моніторингових дослі-

джень щодо поширення й циркуляції в популяціях тварин небезпечних патогенів, а також з дослідницькою метою (вивчення еволюції, екології збудників та особливостей взаємодії вірусів з клітинами пойкилотермних тварин).

2. Субкультури клітин *Xenopus laevis*, *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii* можуть рости у певних живильних середовищах, розроблених для інших клітинних ліній (за умови корекції осмотичного тиску стандартних середовищ до рівня, необхідного для клітин амфібій). У наших дослідях середовища DMEM (SH30243.01; HyClone) і RPMI-1640 (R8758; Sigma-Aldrich®) забезпечували найкращий ріст клітин як амфібій, так і рептилій, найшвидше виповнення моношару й досить високий ПІ. Середовище 199 («Біо Тест Лабораторія», Україна) не забезпечувало достатнього рівня адгезії та проліферації субкультур клітин досліджуваних видів рептилій та амфібій.

3. Дослідження впливу різних температур інкубації на проліферативну активність субкультур клітин *Xenopus laevis*, *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii* дозволили дійти висновку щодо оптимальних температурних умов для вирощування культур клітин даних видів тварин. Для клітин *Xenopus laevis* у діапазоні температур 26–29 °С з підвищенням температури спостерігалося збільшення відсотка прикріплених клітин і темпів росту клітинної культури впродовж усього терміну інкубації. За 23 °С не відбувалося адгезії та проліферації, а при збільшенні температури до 33 °С серед уже прикріплених клітин на 4-ту добу інкубації виявляли ознаки апоптозу (округлення клітин і втрата ними контактів з іншими клітинами, відокремлення клітин від субстрату, вакуолізація цитоплазми тощо). Отже, температурні межі 26–29 °С можна вважати оптимальними для вирощування культури клітин цього виду. Для субкультур клітин *Lacerta agilis* і *Testudo horsfieldii* у ході дослідження температурним оптимумом росту можна вважати показник 29 °С (± 2 °С), оскільки саме тоді фіксували їх найкращий ріст. За найближ-



чих до цієї позначки досліджуваних температур (26 і 33 °C) мала місце суттєво повільніша проліферація, а моношар не утворювався.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буаро М.И. Новые и вновь появляющиеся арбовирусные инфекции: лихорадка чикунгунья / М.И. Буаро, С. Бумбали, Н.М. Трофимов, В.Н. Зайцева и др. // Медицинские новости. – 2008. – № 15. – С. 12–16.
2. Васильев Д.Б. Вирусные болезни рептилий / Д.Б. Васильев, В.С. Швед // Науч. исследования в зоол. парках. – 2007. – № 22. – С. 182–215.
3. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре / Л.П. Дьяконов. – М.: Спутник+, 2009. – 867 с.
4. Клестова З.С. Методичні рекомендації з отримання первинно-трипсинізованих культур клітин холоднокровних тварин / З.С. Клестова, І.В. Савинова, В.І. Білоконь. – К., 2014. – 54 с.
5. Тарасов В.В. Особенности взаимодействия арбовирусом с их беспозвоночными хозяевами / В.В. Тарасов // Матер. I Всерос. совещания по кровососущим насекомым. – СПб.: Зоол. ин-т РАН, 2006. – С. 268–269.
6. Ahne W. Viruses of Chelonia / W. Ahne // Zentralbl Veterinarmed B. – 1993. – Vol. 40 (1). – P. 35–45.
7. Burton N.A. Western Equine Encephalitis Virus in Saskatchewan Garter Snakes and Leopard Frogs / N.A. Burton, J. McLintock, J.G. Rempel // Science. – 1966. – Vol. 154. – P. 1029–1031.
8. Calle P.P. Infectious disease serologic survey in free-ranging venezuelan anacondas (*Eunectes murinus*) / P.P. Calle, Jesu's Rivas // Journal of Zoo and Wildlife Medicine. – 2001. – Vol. 32 (3). – P. 320–323.
9. Can J. Western Equine Encephalitis in Saskatchewan Reptiles and Amphibians / J. Can, J. Spalatin, R. Connell, N. Burton, J. Gollo // Med. Vet. Sci. – 1964. – Vol. 28. – P. 131–142.
10. Can J. Antibody Against Western Equine Encephalitis Virus Occurring in the Serum of Garter Snakes (Colubridae: *Thamnophis*) in Saskatchewan / J. Can, M.G. Prior, R.M. Agnew // Comp. Med. – 1971. – Vol. 35. – P. 40–43.
11. Cell culture basic. Handbook / Gibco. Thermo Fisher Scientific Inc. – 2014. – 167 p.
12. Clark F.H. Growth and Attenuation of Rabies Virus in Cell Cultures of Reptilian Origin / F.H. Clark // Experimental Biology Medicine. – 1972. – Vol. 139. – P. 14–18.
13. Cupp E.W. Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in an eastern equine encephalomyelitis virus focus in central Alabama / E.W. Cupp, D. Zhang, Yue Xin, M. Cupp, S. Guyer // Trop. Med. Hyg. – 2004. – Vol. 71 (3). – P. 272–276.
14. Essbauer S. Viruses of lower vertebrates / S. Essbauer, W. Ahne // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. – 2001. – Vol. 48 (6). – P. 403–475.
15. Gebhardt L. Natural overwintering hosts of the virus of Western equine encephalitis / L. Gebhardt, G.J. Stanton, D.W. Hill, G.C. Collett // New England J. Med. – 1964. – Vol. 271. – P. 172–177.
16. Graham P. Serosurveillance of Eastern Equine Encephalitis Virus in Amphibians and Reptiles from Alabama, USA / P. Graham, H.K. Hassan, T. Chapman // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2012. – Vol. 86 (3). – P. 540–544.
17. Jacobson E.R. Infectious diseases and pathology of reptiles / E.R. Jacobson. – Taylor & Francis Group, 2007. – P. 696.
18. Jacobson E.R. West Nile virus infection in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida / E.R. Jacobson, P.E. Ginn, M. Troutman, L. Farina et al. // Journal of Wildlife Diseases. – 2005. – Vol. 41 (1). – P. 96–106.
19. Jakoby B.W. Cell Culture / B.W. Jakoby, Ira H. Pastan. – London, Academic Press. – 1979. – Vol. 58. – P. 467–474.
20. Klenk K. Alligators as WHV amplifiers / K. Klenk, J. Snow, K. Morgan, R. Bowen et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10 (12). – P. 2150–2159.
21. Nevarez J. West Nile virus in alligator, *Alligator mississippiensis*, ranches from Louisiana / J. Nevarez, M. Mitchell, D. Kim, R. Poston, H. Lampinen et al. // H. Herp. Med. Surg. – 2005. – Vol. 15. – P. 4–9.
22. Schumacher J. Selected Infectious Diseases of Wild Reptiles and Amphibians / J. Schumacher // Journal of Exotic Pet Medicine. – 2006. – Vol. 15. – P. 18–24.
23. Shorthridge K.F. Do in Reptiles Togaviruses and Flaviviruses Persist? / K.F. Shorthridge // Viruses of Lower Vertebrates. – 1989. – P. 120–129.
24. Smith J.C. Xenopus cell lines / J.C. Smith, J.R. Tata // Methods Cell Biol. – 1991. – № 36. – P. 635–654.
25. Thomas L.A. Overwintering of Western equine encephalomyelitis virus in garter snakes experimentally infected by *Culex tarsalis* / L.A. Thomas, C.M. Eklund // Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. – 1962. – Vol. 109. – P. 421–424.
26. Thomas L.A. Susceptibility of garter snakes (*Thamnophis* spp.) to Western equine encephalomyelitis virus / L.A. Thomas, C.M. Eklund, W.A. Rush // Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. – 1958. – Vol. 99. – P. 698–700.
27. Van der Groen G. Growth of Lassa and Ebola viruses in different cell lines / G. Van der Groen, P. Webb, K. Johnson, J. Lange et al. // Ebola virus haemorrhagic fever / S.R. Pattyn, editor. – Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Biomedical Press. – 1978. – P. 255–260.
28. White G. Competency of Reptiles and Amphibians for Eastern Equine Encephalitis Virus / G. White, C. Ottendorfer, S. Graham, T. Unnasch // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2011. – Vol. 85 (3). – P. 421–425.
29. Wildlife diseases fact sheet. – Режим доступу: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Fact_sheets/WD_EN.pdf.
30. WAHIS-Wild Interface, not OIE-listed diseases. – Режим доступу: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahidwild.php/Index#.

Одержано 17.07.2015

Новые биологические системы для детекции возбудителей вирусных инфекций холоднокровных животных. З.С. Клестова, И.В. Савинова

Приведены данные об особенностях культивирования культур клеток холоднокровных позвоночных животных, выбора оптимальных температурных параметров культивирования и питательных сред. Также предоставлено описание морфологической характеристики полученных культур клеток и их особенности при различных условиях культивирования.

New biological systems for the detection of pathogens of viral infections of cold-blooded animals. Z.S. Klestova, I.V. Savinova

These data about the features of cultivation of cell cultures cold-blooded animals, choosing the optimal temperature parameters culturing and culture media. Also provided is the description of the morphological characteristics of the cell cultures and their characteristics under different culture conditions. ☉