

## **БИОЛОГИЯ. ЭКОЛОГИЯ. СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО**

*Абдылдаева Р.Т., Иманов Э.Д., Рустембеков О.С., Адамбеков Д.А.,  
Рысбеков М.Р., Усубалиев А.К., Орозов Ж.Ч.*

### **ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РЕПРОДУКЦИИ ПОКСВИРУСА НА КУЛЬТУРЕ ТКАНИ**

*Для промышленного изготовления культурального вируса вакцины против ОСПЫ должен быть определен оптимальный состав питательной среды.*

**Ключевые слова:** вирус, штаммы, гидролизат.

*For industrial manufacture of cultivated virus vaccine against Pox must be determined the optimal composition of the nourishing environment.*

**Key words:** virus, strain, hydrolysate.

Введение. Успех выращивания первичных культур клеток тканей теплокровных зависит от качества используемых питательных сред. Высокая активность физиологических процессов растущих клеток культур тканей обеспечивается многими факторами выращивания. Одним из факторов, оказывающих влияние на размножение клеток и репродукцию вирусов, является оптимальное соотношение пластических и физиологических активных веществ в питательной среде. Составные компоненты питательной среды можно разделить на 4 группы:

1) неорганические соли, входящие в солевой раствор, 2) аминокислоты и витамины, 3) глюкоза, 4) нативная сыворотка.

С целью определения питательной потребности инфицированных клеток культуры и максимального накопления вируса оспы нами испытаны различные концентрации гидролизата лактальбумина, глюкозы и сыворотки в поддерживающей среде, приготовленной на сбалансированном солевом растворе Хенкса.

Определение оптимального состава питательной среды, обеспечивающего хороший рост клеток в культуре и репродукцию вируса оспы в этой системе, преследует цель установления технических условий промышленного производства культуральной вирус-вакцины данного заболевания. Изготавливаемый препарат, по возможности, должен быть дешевым и приготовлен из доступных ингредиентов. Естественно, внесение какого-либо дополнительного компонента в питательную среду приведет к удорожанию конечной продукции. Недостаточное количество необходимого компонента в питательной среде может явиться причиной гибели клеток в культуре ткани и полной непригодности препарата, особенно в вакцинном производстве.

Таким образом, для промышленного изготовления культурального вируса вакцины против оспы должен быть определен оптимальный состав питательной среды и более

рациональный метод её приготовления применительно к данному объекту.

Опыты по определению питательной потребности культуры клеток кожи плода овцы и почечного эпителия при размножении вируса оспы проводили параллельно. В результате установлено, что ни по интенсивности накопления вирусов, ни по цитоморфологическим показателям они не различаются.

#### **Материалы и методы.**

Штаммы вируса. Культуральный штамм «И», выделенный от больного ягненка в 1995г., прошел 10 пассажей на первичной культуре клеток кожи плода овцы, титр 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Питательные среды и другие ингредиенты. Питательные среды и солевые растворы готовили по классической прописи, применяемой в вирусологической практике. Питательные среды для приготовления культур ткани готовили на депонизированной дистиллированной воде. Во всех опытах в основе питательной среды использовали сбалансированный солевой раствор Хенкса, среду 199, поставляемую Томским научно-исследовательским институтом вакцин и сывороток МЗ СССР.

Приготовление первичной однослойной культуры ткани. Эмбриональные ткани диспергировали по методу Янингеру (1954) в модификации Иванощемкова (1964), а почки взрослой овцы по Bodian (1956).

#### **Результаты и обсуждение.**

а) Репродукция вируса оспы при различном содержании гидролизата лактальбумина

Известно, что интенсивность размножения и степень накопления вируса зависят от многих факторов, оказывающих положительное или отрицательное действие на физиологическое состояние клеток, в которых размножается вирус.

Нами изучалось влияние различной концентрации гидролизата лактальбумина (ГЛА) в питательной среде на репродукцию вируса оспы (1, 2).

Аминокислоты, находящиеся в гидролизате лактальбумина в качестве пластического материала и стимулятора роста, необходимы для выращивания и поддержания физиологических функций клеток и репродукции вирусов в культуре ткани. Нашей целью было определение оптимального содержания этого препарата к питательной среде, обеспечивающей максимальное накопление данного возбудителя. Для этого использовалась питательная

среда, приготовленная на солевом растворе Хенкса с различным содержанием гидролизата лактальбумина (0,1; 0,5; 1,0%) с постоянным содержанием бычьей сыворотки.

Во всех трех параллельно проведенных опытах первичную культуру клеток кожи плода и почечного эпителия овцы при формировании полного монослоя заражали 0,2 мл вирусосодержащего материала с титром  $10^{6,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл в соотношении 1:10. Через 1 ч контакта при комнатной температуре неадсорбированный вирус сливали, культуральные пробирки заливали поддерживающей средой с соответствующим содержанием ГЛА и инкубировали при 37°C. Через каждые 24 ч раствор просматривали под микроскопом и брали пробы для титрования.

Установлено, что через 24 ч в зараженной культуре ткани с 0,1% ГЛА клетки были без заметных морфологических изменений, но во всех зараженных культуральных пробирках обнаруживались единичные округлые клетки, диффузно расположенные по всей поверхности монослоя. В зараженной культуре с 0,5% ГЛА число округлых клеток было несколько больше. С 1,0% ГЛА в зараженной культуре находили те же изменения, что и при 0,5%-ном содержании, но пораженные клетки были сильнее увеличены, и их цитоплазма была заметно зернисто перерождена.

Через 48 ч инкубирования в зараженной культуре с 0,1% ГЛА наблюдалась зернистость цитоплазмы клеток, и пораженные клетки располагались группами мелких очагов. В зараженной культуре с 0,5% ГЛА регистрировалось накопление гигантских клеток, резко преломляющий свет. В среде с 1,0% ГЛА клетки были несколько темнее, более крупными и округлыми с нитоплазматическими гранулами.

Через 72 ч инкубирования в зараженной культуре с 0,1% ГЛА регистрировались гроздевидные скопления пораженных клеток. Зараженная культура с 0,5% ГЛА содержала большее количество округлых полиформных и гигантских клеток, чем культура, содержащая 0,1%. Число пораженных клеток и такой культуре составляло около 40-50%. В культуре с 1,0% ГЛА было поражено и морфологически изменено около 30% клеток. Они были округлыми, зернистыми и увеличенными, отдельные клетки были веретенообразной формы.

Через 96 ч после заражения в культуре с 0,1% ГЛА находили значительно больше гигантских клеток, пораженные клетки отслаивались от стекла, образуя «окна». Поражение клеток составляло около 70%. В среде с 0,5% ГЛА клетки в зараженной культуре оказывались резко дегенерированными,

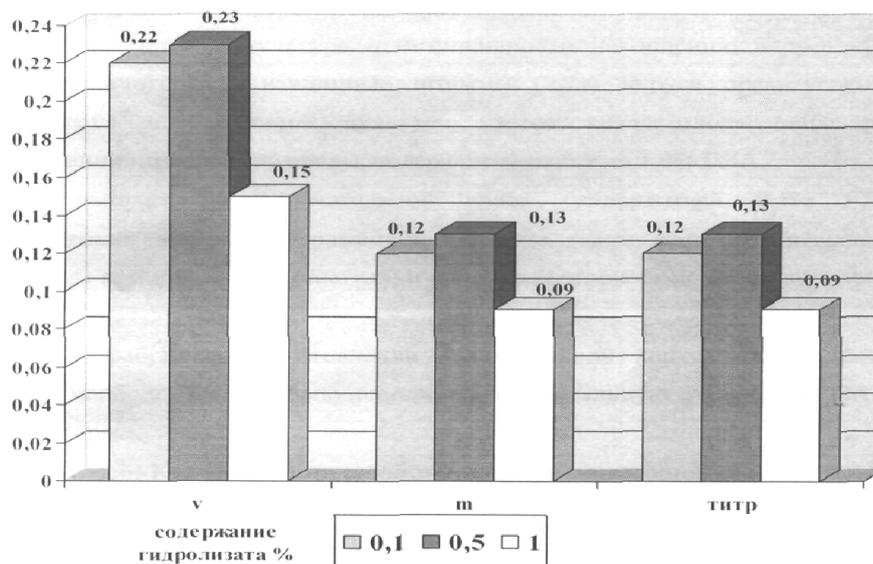
монослой заметно разрыхленным, гибнущие клетки были заметно сморщены и многие сползли со стекла. Находили также скопления гигантских клеток, которые позднее округлялись, формируя шарообразные комочки, между которыми были типы утонченные цитоплазматические тяжи. Зараженные клетки с 1,0% ГЛА были более темными и сморщенными. Наблюдалось появление цитоплазматических тканей и отторжение клеток от стекла.

Через 120 ч после заражения в культуре ткани с 0,1% ГЛА цитопатические изменения характеризовались появлением гигантских клеток, большинство имело веретенообразную форму. В это же время в культуре с 0,5% ГЛА обнаруживалось почти полное отторжение клеток от стекла. Появившиеся гигантские клетки с длинными цитоплазматическими тканями образовывали причудливые формы. В среде с 1,0% ГЛА в зараженной культуре ткани также наблюдались очаги скопления округлых светопреломляющих клеток. В цитоплазме пораженных клеток обнаруживались вакуоли различной величины, иногда большие ядра.

Через 144 ч инкубирования в зараженной культуре ткани с 0,1% ГЛА клетки были поражены, часть их отпадала от стекла в культуральную жидкость, а оставшиеся на стекле сморщились и потемнели. Цитоплазма дегенерированных клеток была гомогенной. В зараженной культуре с 0,5% ГЛА монослой был сильно разрушен, а клетки полностью дегенерированы. Пораженные клетки оказывались как бы собранными в отдельные шарообразные комочки с цитоплазматическими длинными тяжами. При 1,0% ГЛА клетки были полностью и сильно дегенерированы с продолговатыми овальными ядрами. Цитоплазма клеток была полностью гомогенной. Наблюдалось почти полное отторжение клеток от поверхности стекла.

Через 168 ч в зараженной культуре с 0,1% ГЛА на поверхности стекла осталось менее 10% дегенерированных клеток, все они были сморщенными с гомогенной цитоплазмой и обособленными друг от друга. При 0,5% ГЛА на стекле оставалось менее 5% клеток. Разрушенные и дегенерированные клетки оставляли после себя обрывки цитоплазмы. При 1,0% ГЛА находили скопления отдельных неотторгнувшихся клеток. Все они были сморщенными, несколько потемневшими, а цитоплазма - мелкозернистой. Средние данные трех опытов, но накоплению вируса оспы в первичной культуре кожи плода овцы при различном содержании гидролизата лактальбумина приведены в Рис. 1

Накопление вируса оспы в культуре ткани с различным содержанием гидролизата лактальбумина в поддерживающей среде через 120 ч после заражения



В результате проведенных исследований установлено, что вирус оспы успешно размножается в культуре клеток кожи плода овцы и почечного эпителия при содержании гидролизата лактальбумина от 0,1 до 1,0%. Однако накопление в более высоком титре определяется при использовании питательной среды, содержащей 0,5% ГЛА.

Степень выраженности и скорость проявления цитопатического действия вируса зависят от количества гидролизата лактальбумина в поддерживающей среде. При выращивании возбудителя в культуре клеток с 0,1 и 0,5% препарата изменение клеток начинается на 12 ч раньше, чем при 1,0%.

Цитоморфологические изменения клеток в зараженной культуре ткани при содержании ГЛА от 0,1 до 1,0% однотипны и характеризуются цитоденеративными и деструктивными процессами.

На основании результатов проведенных опытов по сравнительному изучению влияния количественного содержания ГЛА в питательной среде на размножение клеток в культуре и интенсивности накоплению вируса оспы можно заключить, что вакцинные штаммы («И») вируса оспы успешно размножаются в первичной культуре клеток кожи плода овцы при использовании питательной среды, содержащей от 0,1 до 1,0% ГЛА;

при использовании питательной среды, содержащей 0,5% ГЛА, цитопатический эффект в зараженной культуре ткани наступает несколько раньше, чем при других количествах, и наблюдается максимальное накопление вируса;

при биофабричном изготовлении культуральной вирус вакцины против оспы овец наиболее рационально использовать питательную среду 0,5% ГЛА.

**б) Концентрация глюкозы в поддерживающей среде**

Глюкоза как энергетический материал является важным компонентом питательной среды.

Интенсивность потребления глюкозы зараженных культур клеток неодинакова. Поэтому нашей целью было изучение влияния различной концентрации глюкозы в поддерживающей среде на репродукцию вируса контагиозной эктимы в культуре клеток кожи плода и почечного эпителия овцы. Использовалась поддерживающая среда, приготовленная на основе солевого раствора Хенкса, с 0,5%-ным содержанием гидролизата лактальбумина, 2% бычьей сыворотки и с добавлением глюкозы (0,1; 0,5; 1,0%).

Монослойную культуру клеток кожи плода овцы и почки заражали 0,2 мл па одну пробирку вирусного материала с титром  $1,0^{6,0}$  ГЦД<sub>50</sub>/мл. После часового контакта при комнатной температуре неадсорбированный вирус сливали и заливали поддерживающую среду с определенным содержанием глюкозы. Ежедневно проводили цитоморфологические наблюдения и брали пробы на фильтрование. При этом питательную среду в зараженной культуре ткани не меняли.

Результаты трех опытов показали, что через 24 ч после заражения морфологическое состояние клеток культуры с 0,1% глюкозы было аналогично таковому незараженной культуры. Лишь в отдельных пробирках находили небольшие скопления (по 2-3 в поле зрения) округлых светопреломляющих клеток. С 0,5%-ным содержанием глюкозы клетки зараженной культуры морфологически также были сходны с клетками незараженной. Отмечалось незначительное увеличение числа округленных сильно увеличенных клеток, которых было несколько больше, чем с 0,1% глюкозы. В среде с 1,0% глюкозы клетки зараженной культуры были увеличены, округлены, но без резких морфологических изменений.

Через 48 ч в клетках зараженной культуры с 0,1%-ным содержанием глюкозы были заметны цитоморфологические изменения. Клетки оказыва-

лись несколько увеличенными и округленными. Цитоплазма клеток была мелкозернистой, некоторые из них были вакуолизированные. Клетки в зараженной культуре с 0,5% глюкозы были также увеличены, округлены. Дегенерация клеток носила очаговый характер. Изменения наблюдались как в ядре, так и в цитоплазме. При 1,0% глюкозы в среде в зараженной культуре встречались клетки, в которых цитоплазма в виде плотного комочка отслаивалась от оболочки клетки.

Через 72 ч инкубирования зараженная культура с 0,1% глюкозы характеризовалась заметными цитоморфологическими изменениями клеток и равномерным появлением по всей поверхности монослоя гигантских преломляющих свет клеток. При 0,5% глюкозы зараженный клеточный монослой становится разреженным, некоторые клетки отслаивались от стекла и свободно плавали в культуральной жидкости. Находили гигантские клетки, которые позднее были заметно округлены и имели зернистую цитоплазму. Поражение клеток в зараженной культуре составляло около 50%. В зараженной культуре с 1,0% глюкозы в монослое также отмечалась дегенерация клеток, пораженные клетки были сморщенными, более темными, легко отделялись от стекла и свободно плавали в культуральной жидкости.

Через 96 ч инкубирования в зараженной культуре с 0,1% глюкозы наблюдалось увеличение размеров очагов поражения клеток в монослое. Отдельные клетки были округлены, а некоторые имели веретенообразную форму. При 0,5% глюкозы в зараженной культуре находили гигантские клетки, дегенерированные клетки располагались в виде гроздевидных скоплений. В культуре с 1,0% глюкозы отмечались изменения, описанные выше.

После 120-часового инкубирования в зараженной культуре с 0,1% глюкозы монослой был почти

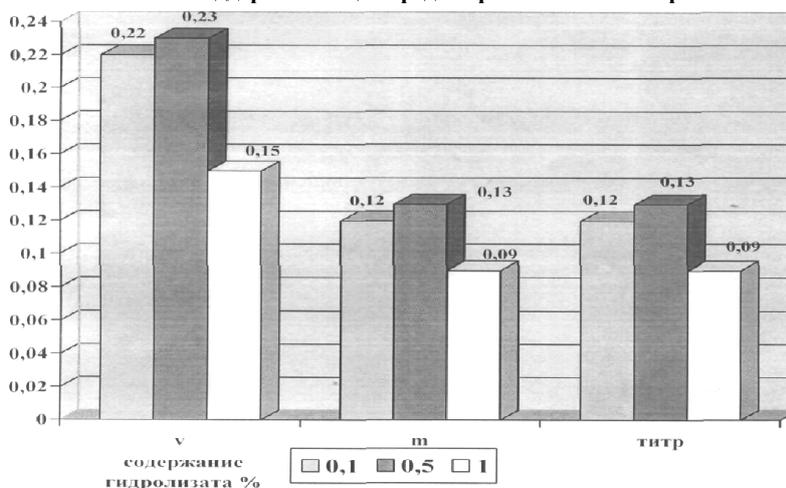
полностью разрушен. Между деформированными гроздевидными скоплениями клеток были видны цитоплазматические ткани. На стекле оставалось менее 20% пораженных клеток. В среде с 0,5% глюкозы в зараженной культуре все клетки были дегенерированы, и на поверхности стекла оставалось очень мало клеток, сохранивших структурную форму. Цитоплазма деформированных клеток была преимущественно гомогенной, без заметных включений, и лишь кое-где на стекле отмечались цитоплазматические тяжи, соединяющие отдельные клетки. В зараженной культуре с 1% глюкозы клетки, оставшиеся на стекле, были серые, сморщенные, с аморфной цитоплазмой.

Через 144 ч после заражения в инфицированной культуре с 0,1% глюкозы клеточные скопления были бесформенными и при встряхивании легко отставали от стекла. В культуре с 0,5% глюкозы оставались единичные клетки, рассеянные диффузно, которые легко отторгались от стекла. К этому времени в зараженной культуре с 1%-ным содержанием глюкозы клеточный монослой был почти полностью разрушен и между оставшимися на стекле дегенерированными клетками отмечались цитоплазматические тяжи и их следы. В это время на стекле обнаружилось около 5% пораженных клеток (Рис. 2).

Из Рис.2 видно, что вирус оспы успешно размножается в культуре ткани при содержании глюкозы от 0,1 до 1,0%. Однако, при выращивании его в культуре ткани со средой, содержащей 0,5% глюкозы, вирус накапливается в более высоком титре ( $10^{6,77}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл). Таким образом, содержание глюкозы в питательной среде от 0,1 до 1,0% не оказывает заметного влияния на скорость размножения вируса контагиозной эктимы и морфологию цитопатических изменений.

Рис.2

**Накопление вируса Оспы в культуре ткани с различным содержанием глюкозы в поддерживающей среде через 120 ч после заражения**



Цитопатические изменения в зараженной культуре клеток при различном содержании глюкозы морфологически однотипны. Их интенсивность зависит от продолжительности инкубирования. Для биофабричного изготовления культуральной вирусвакцины против оспы овец целесообразно использовать поддерживающую питательную среду, содержащую 0,5% глюкозы (1, 2).

Закключение. Для изготовления вакцины необходимо использовать поддерживающую питательную среду, содержащую 0,5% глюкозу.

**Литература:**

1. Иманов Э.Д., Адепова А.А., Хандуев И.И., Салидинов Б.С. Биология и биотехнология вируса орфа. Бишкек, Илим-1993.
  2. Иманов Э.Д., Адамбеков Д.А., Рустембеков О.С. и др. Биопрепараты (руководство). Бишкек, 2007.
-