

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

ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ОСПЫ

Для культивирования клеток и вирусов в опытах использовалась питательная среда с рН в пределах 6,2-8,4 с 2% сыворотки, 0,5% ГЛА и 0,1% глюкозы.

Ключевые слова: клетка, вирус, среда, сыворотка, глюкоза.

For cultivating of cells and viruses in experiments it was used nourishing environment with pH in limits of 6,2-8,4 with 2% serum, 0,5% hydrolysate and 0,1% glucose.

Key words: cell, virus, environment, serum, glucose.

Введение. Для поддержания жизнедеятельности клеток и нормального функционирования их в культуре необходим источник белкового питания. В качестве такого источника для размножения клеток тканей и вирусов широко используют сыворотку крови. Кроме того, сыворотка играет большую роль в прикреплении клеток к стеклу. Для выращивания клеток и вирусов применяют сыворотки различных животных.

Объекты и методы исследований.

В опытах по получению первично трипсинизированных культур клеток использовали каждую ткань плодов овцы и крольчихи.

Дезагрегацию ткани проводили 0,25%-ным раствором трипсина фирмы «Дифко», смесью растворов трипсина (0,25%) и версена (0,02%) в разных соотношениях, разной продолжительности воздействия, температурного режима. Культивирование клеток из кожной ткани проводили с использованием питательных сред: 0,5% гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса, среды Игла, 199, на основе гидролизата сывороточных белков молока (0,5% ГСБМ). сыворотка крови крупного рогатого скота, телят-до норов, новорожденных телят, плода овцы, плода коровы. Клетки выращивали в пробирках, стеклянных флаконах объемом 100-3000 мл, роллерных бутылках в СД₂-инкубаторе при 37°C. Цитологические препараты фиксировали в одной из фиксирующих смесей: растворе Буэна, метиловом спирте, 70° этиловом спирте. Окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимза или гематоксилин-эозином.

Для заражения культур клеток использовали вирус оспы и орфа.

Инфекционный титр вируса определяли по ЦПД в пробирочных культурах клеток и вычисляли по методу Рида и Менга.

Результаты и обсуждение.

а) Процентное содержание бычьей сыворотки

Нами использовалась сыворотка крупного рогатого скота, которая входила и состав среды в различном количестве. Целью опытов было

определение оптимального содержания сыворотки в культуральной питательной среде для размножения вируса оспы в культуре ткани. Использовали питательную среду НА солевом растворе Хенкса с добавлением 0,5% ГЛА, 0,1% глюкозы и 2, 5, 10% сыворотки. Через каждые 24 ч культуру ткани микроскопировали и брали пробы для титрования.

Через 24 ч после инкубирования в инфицированной культуре находили и единичные, заметно округлившиеся, сравнительно крупные клетки с гранулами и цитоплазме. В зараженной культуре клеток с 2%-ным содержанием сыворотки наблюдалось наибольшее число таких клеток, в то время как в культуре с 10%-ным содержанием сыворотки они встречались значительно реже. Несмотря на небольшие морфологические различия, вирус в зараженных культурах во всех опытах накапливался в титре 10^{3,0} ТЦД₅₀/мл. В дальнейшем пораженные клетки увеличивались в размере, и пораженные участки монослоя начинали захватывать соседние клетки. Цитоплазма пораженных клеток становилась более зернистой.

Через 48 ч инкубирования в зараженной культуре ткани с 2% сыворотки регистрировались небольшие участки, свободные от клеток («окна»). В зараженной культуре с 5%-ным содержанием сыворотки отмечались подобные изменения клеток. В цитоплазме отдельных клеток были шарообразные комочки. В зараженной культуре с 10% сыворотки наблюдались аналогичные изменения, но число гигантских клеток было несколько больше.

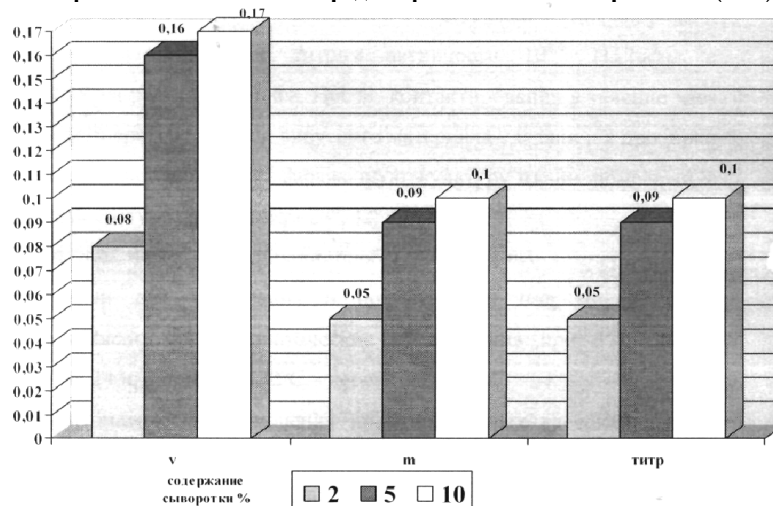
По мере усиления цитопатического действия происходила цитоагломерация и поражение клетки приобретали вид грозди винограда. Из-за нарушения адгезивных свойств клеток под действием вируса и развития дегенеративных изменений они отпадали от стекла.

Через 96 ч инкубирования в зараженной культуре с 2% сыворотки почти все клетки были поражены, и на стекле остались лишь отдельные округлившиеся, разбухшие и дегенерированные клетки.

В дальнейшем в зараженной культуре оставалась только часть клеток на стекле, образующих сетчатую структуру монослоя, а титр постепенно снижался. Результаты проведенных опытов по накоплению вируса оспы в первичной культуре клеток кожи плода и почечного эпителия овцы с различным количественным содержанием бычьей сыворотки представлены в Рис.1.

Накопление вируса оспы в культуре ткани с различным содержанием сыворотки в питательной среде через 120 ч после заражения (n=3)

Рис.1



Из рисунка видно, что вирус оспы хорошо размножается в питательной среде с содержанием сыворотки от 2 до 10%, но наиболее высокий титр наблюдается на 5-е сутки его выращивания в культуре ткани с 2% сыворотки ($10^{6,5}$ ТЦД₅₀/мл).

Цитопатические изменения с 2% сыворотки начинаются раньше и более интенсивны.

б) Степень накопления вируса при температурном разбросе инкубирования

В остальных условиях вирус оспы развивается в эпителиальных клетках кожи, подверженных наиболее значительным колебаниям температуры окружающей среды. Возможно, сравнительно низкая температура инкубации культуры, зараженной данным вирусом, соответствует условиям его естественного паразитирования и способствует его репродукции. С этой целью определяли оптимальную температуру репродукции вируса оспы в культуре клеток кожи плода и почечного эпителия овцы. Степень накопления определяли в динамике по суткам выращивания методом титрования в первичной культуре клеток почечного эпителия овцы и по развитию цитопатического эффекта.

Культуру ткани после образования монослоя инфицировали вирусосодержащим материалом с титром активности $10^{6,0}$ ТЦД₅₀/мл в соотношении

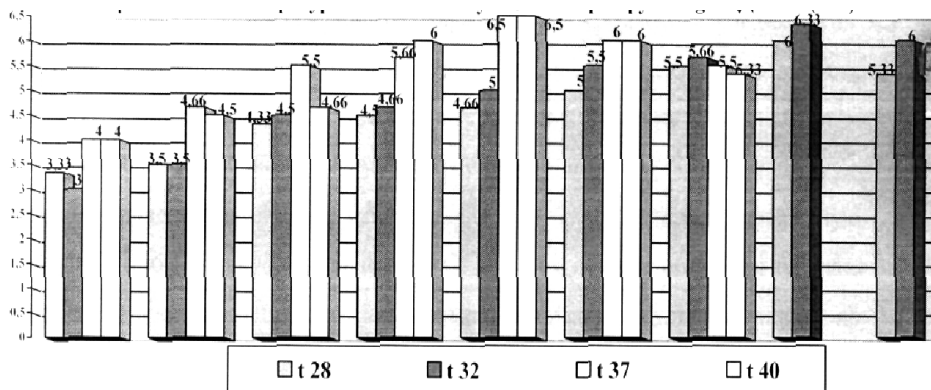
1:10 на растворе Хенкса. После контактирования в течение часа при комнатной температуре остаток вирусного материала удаляли и в пробирки заливали поддерживающую среду. Зараженную культуру ткани помещали в термостаты с температурным режимом 28°, 32° 37°, 40°.

Ежедневно, т.е. через 24 ч, брали пробы по каждому температурному режиму инкубации для титрования и посматривали под микроскопом. Наблюдения показали, что цитопатические изменения при 37° и 40°С начинаются через 24 ч, а при 28° и 32°С - через трое суток.

В целом цитопатические изменения инфицированных клеток культуры ткани по морфологии были однотипными и аналогичными наблюдаемым при инкубации в условиях 37°С, но начинались в различное время. Динамика накопления вируса по суткам выращивания показана в рис.2,

Размножение вируса оспы в первичной культуре клеток кожи плода овцы при различных температурах по часам инкубации. Титр вируса в lg ТЦД₅₀/мл (n=5)

Рис.2



Из рисунка видно, что вирус оспы успешно размножается в первичной культуре клеток кожи плода и почечного эпителия овцы при инкубации в пределах 28-40°С. Однако, сравнительно интенсивное накопление вируса наблюдается при 37°С. При относительно низких (28°С и 32°С) температурах размножение вируса несколько задерживается и достигает максимума значительно позже.

в) Влияние концентрации водородных ионов

На физиологическое состояние клеток культуры тканей значительное влияние оказывает концентрация водородных ионов (рН). Для более высокой выживаемости первично - трипсинизированных клеток и репродукции вирусов в культуре ткани рН среды должна быть близка к нейтральной. Однако, некоторые зараженные клетки тканей млекопитающих могут выдерживать и значительные колебания рН (6,6-8,0). При размножении клеток в культуре наблюдается снижение рН за счет накопления кислых продуктов метаболизма.

Пашей целью было установление оптимального значения рН поддерживающей среды, обеспечивающей размножение данного возбудителя в культуре клеток кожи плода и почечного эпителия овцы.

В опытах использовалась питательная среда с рН в пределах 6,2-8,4 с 2% бычьей сыворотки, 0,5% ГЛА и 0,1% глюкозы.

Монослойную культуру клеток заражали материалом с титром 10^{10} ТЦД₅₀/мл в соотношении 1:10 на растворе Хенкса. Контактывал вирус с клетками при комнатной температуре в течение часа. Затем неадсорбированный вирусный материал сливали, вносили поддерживающую среду со значениями рН 6,2; 6,5; 6,8; 7,1; 7,4; 7,7; 8,0; 8,4 в зараженную культуру клеток и инкубировали при 37°C. Во всех опытах получены близкие результаты,

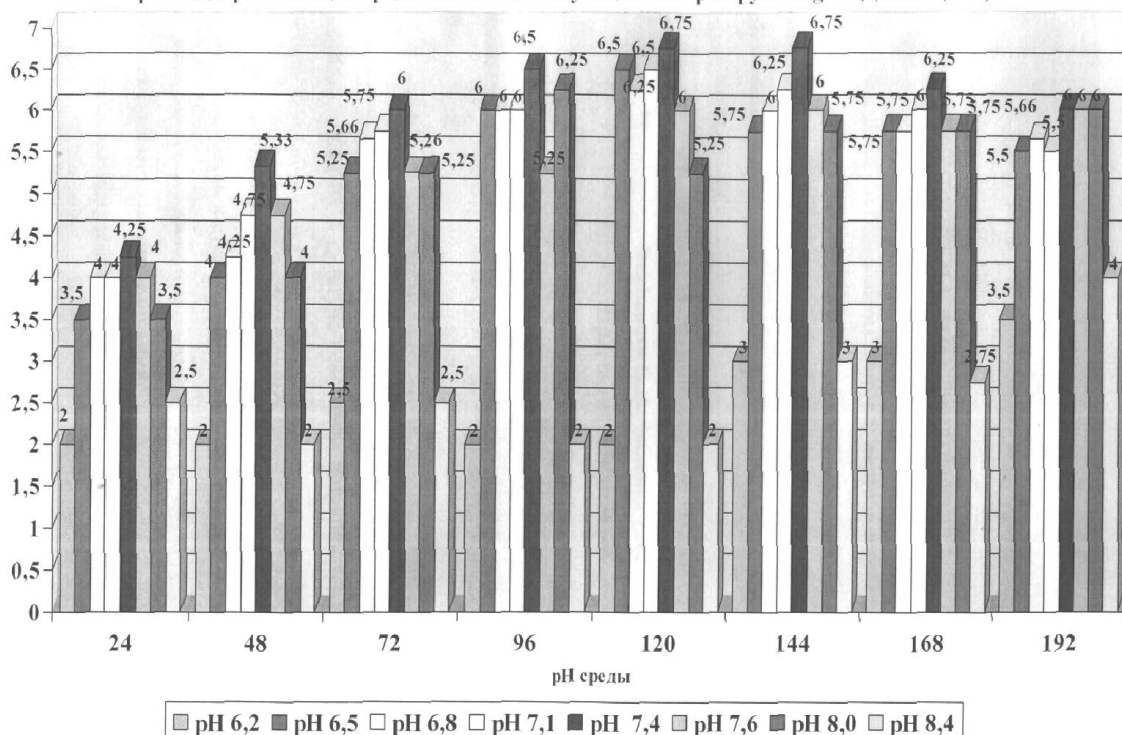
указывающие на размножение вируса в культуре ткани при использовании поддерживающей среды с рН от 6,5 до 8,0. Однако при сравнительно высоких (8,4) и низких (6,2) рН поддерживающей среды наблюдались поздние и слабые дегенеративные изменения клеток культуры. В такой клеточной системе вирус размножался, плохо и накапливался в низком титре ($10^{3,0}$ ТЦД₅₀/мл на 6-е сутки инкубирования). Максимальное накопление вируса в инфицированной культуре ткани происходило при использовании среды с рН 7,4, и титр составлял $10^{6,75}$ ТЦД₅₀/мл (Рис.3).

Динамика размножения вируса в первичной культуре клеток плода овцы с применением поддерживающей среды с различными значениями рН показана в Рис.3. При этом цитопатическое действие вируса выражалось в набухании и округлении клеток, утрате межклеточных связей и последующем пикнозе с развитием деструктивных явлений, что свойственно для данного возбудителя при оптимальных условиях размножения. Отмечалось образование гроздевидных скоплений пораженных клеток (1, 2).

Заключение.

В результате опытов было определено оптимальное содержание сыворотки в культуральной питательной среде для размножения вируса ОСПы с добавлением 0,5% ГЛА.

Размножение вируса орфа в первичной культуре клеток кожи плода овцы при различных значениях рН поддерживающей среды по часам инкубации. Титр вируса в lg ТЦД₅₀/мл (n=3)



Литература

1. Адамбеков Д.Л., Иманов Э.Д., Рустембеков О.С., Иманалиев М.И. Вакцины. Бишкек, 2004, стр.160.
 2. Иманов Э.Д., Рустембеков О.С., Нургазиев Р.З. Биология ДНК-содержащих вирусов. Б., 2003, с.219.