

На правах рукописи

ВАНГЕЛИ СЕРГЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
КУЛЬТУР КЛЕТОК, ХРОНИЧЕСКИ ИНФИЦИРОВАННЫХ
ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (ФГБНУ ВИЭВ).

Научные руководители:

доктор ветеринарных наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, академик Российской академии наук **Михаил Иванович Гулюкин**
кандидат биологических наук, Лауреат Премии Советов Министров СССР, Заслуженный ветеринарный врач РФ **Григорий Андреевич Надточей**

Официальные оппоненты:

Валихов Алексей Федорович, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева», профессор кафедры

Косовский Глеб Юрьевич, доктор биологических наук, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий», директор

Ведущая организация: ФГБНУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2015 года в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.01 при ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1, тел. (495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЭВ.
Диссертация опубликована на официальном сайте ФГБНУ ВИЭВ – <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2015 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

И. Ю. Ездакова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Лейкоз крупного рогатого скота – хроническая лимфопролиферативная болезнь, протекающая бессимптомно или проявляющаяся лимфоцитозом и злокачественными новообразованиями в кроветворных и других органах и тканях. Среди болезней сельскохозяйственных животных гемобластозы занимают ведущее место по частоте и тяжести заболевания, которыми определяются прямые экономические потери скотоводческой отрасли разных стран: от снижения продуктивности животных, их гибели, затрат на диагностические исследования, организацию мероприятий по борьбе с инфекцией и ее ликвидации, потерь от ограничений на торговлю племенными животными, семенем и яйцеклетками племенных животных (D.M. Driscoll et al., 1977; J. Brenner et al., 1989; A. Kurdietal et al., 1999; K. Trono et al., 1999; D.D. Motton et al., 2003; S.M. Rodrigus et al., 2011). Инфицированность скота лейкозом в Российской Федерации долгие годы колеблется на уровне 10%. В структуре инфекционной патологии с 1997 года лейкоз КРС занимает одно из первых мест и в настоящее время составляет более 60% (М.И. Гулюкин и соавт., 2011).

Причиной возникновения и развития болезни является РНК-содержащий вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС), относящийся к семейству *Retroviridae*, подсемейству *Oncoviridae*, роду *Deltaretrovirus*. Этот экзогенный вирус в естественных условиях поражает только крупный рогатый скот. Вирус может размножаться в культурах клеток крупного рогатого скота, овцы, человека, обезьян, собаки, козы и лошади. В экспериментальных условиях чувствительными к инфекции оказались буйвол, овца, коза, свинья, лошадь, обезьяна, кролик (М.И. Гулюкин и соавт., 1987, 2008; M. Levut et al., 1997). Вопрос о способности вируса передаваться человеку остается открытым (M.J. Burr ridge, 1981; Е.А. Климова, Г.Ю. Косовского, 2012).

В нашей стране с помощью электронной микроскопии впервые был обнаружен и описан вирус лейкоза крупного рогатого скота сотрудниками

Всесоюзного научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Г.А. Надточеем и А.Ф. Валиховым в 1974 г. Ими были изучены морфология и пути морфогенеза вируса лейкоза. Большой вклад в изучение морфологии лимфоидных клеток при гемобластозах крупного рогатого скота внесла З.Н. Меньшикова (1984, 1987, 1999).

Многочисленные исследования были направлены на изучение биологических особенностей лейкозной клетки, факторов лейкозогенеза, иммунологических и биохимических аспектов лейкозного процесса, а также на выяснение роли ретровирусов в механизме возникновения лейкозов сельскохозяйственных животных.

Большим достижением в лейкозологии является выявление этиологического фактора при Т-клеточном лейкозе (лимфоме) человека - ретровируса типа С, имеющего большое сходство с ВЛ КРС. В этой связи изучение этиологии и патогенеза лейкозов крупного рогатого скота имеет общебиологическое значение в свете решения вопросов о потенциальном использовании лейкозов крупного рогатого скота, как модели для изучения лейкемогенеза и вирусного канцерогенеза у человека (З.Н. Меньшикова, 1999; M.D. Lairmore, 2014).

Применение современных молекулярно-биологических методов исследования позволило получить новые данные о лейкозогенезе, установить вирусную природу лейкоза крупного рогатого скота, описать этиологический агент - вирус лейкоза крупного рогатого скота, ВЛ КРС (в зарубежной литературе BLV — bovine leukemia virus), изучить его строение, антигенный состав, разработать чувствительные методы диагностики (А.Ф. Валихов и соавт., 1974, 1979, 1996; Г.А. Надточей и соавт., 1976; З.Н. Меньшикова, 1984, 1987; В.П. Шишков и соавт., 1985; А.Н. Попов и соавт., 1993; О.А. Верховский 2002, 2007; J.M. Miller et al., 1969; Y. Calafat et al., 1974; E.J. Kelly et al., 1993; C. Simard et al., 2000).

Методы и средства специфической профилактики лейкоза не разработаны, поэтому все программы по профилактике и ликвидации инфекции основаны

на серологической диагностике ее и ликвидации или изолировании инфицированных животных.

В состав иммунологических диагностических тест-систем входит антиген ВЛ КРС. Наибольшее распространение для накопления антигена и изучения структуры и биосинтеза компонентов BLV получила перевиваемая клеточная линия FLK-BLV, полученная в США M.J. Van der Maaten et J.M. Miller (1974, 1976). Эта линия клеток отличается стабильностью и высоким уровнем продукции как вирионов, так и растворимого наружного гликопротеида gp51 и широко используется во всем мире для его производства [143]. Использование в диагностических наборах гликопротеида gp51 обусловлено рядом факторов. В процессе развития инфекции в организме животного антитела к этому антигену появляются раньше, чем к другим антигенам вируса, этот антиген проходит процесс гликозилирования и рефолдинга в клетках восприимчивого животного и несет наиболее полные иммунодоминантные эпитопы возбудителя.

Несмотря на значительные успехи методов генной инженерии в получении антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота в бактериальной системе (H. Siakkou et al., 1990), системе дрожжей (M. Legrain et al., 1989), системе рекомбинантного вируса коровьей оспы (S. Kumar et al., 1990) и системе бакуловируса (S. Russo et al., 1998) широкого практического применения такие антигены пока не нашли (К.Н. Мукантаев и соавт., 2013).

Работы по получению и изучению новых перевиваемых клеточных линий, активно продуцирующих антигены вируса лейкоза остаются актуальными. Так, бельгийскими исследователями в 2004 г. получена перевиваемая линия клеток P0714, которая хронически инфицирована вирусом лейкоза крупного рогатого скота (D. Veier et al., 2004). В нашей стране были получены две перевиваемые культуры клеток, хронически инфицированные ВЛ КРС - клетки тимуса эмбриона коровы ТЭК МВА-76 (В.А. Крикун, В.П. Шишков и соавт., 1979) и клетки легкого эмбриона коровы ЛЭК-ВИЭВ-90 (М.И. Гулюкин, Л.П. Дьяконов и соавт., 1992). Эти линии клеток также

продуцируют ВЛ КРС, однако они еще недостаточно изучены.

Изучение ультраструктуры и морфологии вирус-продуцирующих культур клеток является необходимым не только в теоретическом плане, но и для практических целей в диагностике сложных случаев заболевания, изучения особенностей морфогенеза вируса лейкоза, упорядочения классификации и дифференциальной диагностики гемобластозов крупного рогатого скота.

Цель работы - получить новые данные о культурально-морфофункциональных, цитогенетических и ультраструктурных особенностях клеток перевиваемых линий FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота.

Для достижения намеченной цели были поставлены следующие **задачи**:

- Изучить культурально-морфофункциональные свойства клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK -BLV.
- Изучить цитогенетические особенности клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK - BLV.
- Изучить ультраструктуру клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK - BLV.
- Изучить особенности морфогенеза вируса лейкоза крупного рогатого скота в клетках естественно восприимчивого (ЛЭК-ВИЭВ-90) и гетерологичного (FLK-BLV) видов животных.
- Определить антигенпродуцирующую активность gp51 клеточной линии ЛЭК-ВИЭВ-90 в сравнении с клеточной линией FLK-BLV.

Научная новизна. Впервые методом электронной микроскопии изучена субмикроскопическая морфология клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90; показана продукция этой культурой антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота. Методом электронной микроскопии в культурах ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV выявлен вирус диареи крупного рогатого скота, что подтверждено методом ПЦР в результате обнаружения в этих культурах генома вируса диареи крупного рогатого скота. Установлено также, что вирусы лейкоза и диареи крупного рогатого скота могут вызывать смешанную инфекцию одних и тех же клеток и формировать при этом морфологически полные

вирионы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Перевиваемая клеточная культура ЛЭК-ВИЭВ-90 может быть использована для получения антигена gp51 генотипа вируса лейкоза, циркулирующего в популяции крупного рогатого скота Российской Федерации.

Учитывая контаминацию клеточных культур ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV вирусом диареи крупного рогатого скота, а также широкое распространение вирусов лейкоза и диареи в популяции крупного рогатого скота, использование живых вакцин против вирусной диареи на территории Российской Федерации, крайне важным является использование в диагностических наборах на лейкоз моноспецифических преципитирующих сывороток к вирусу лейкоза.

Перевиваемая культура ЛЭК-ВИЭВ-90 может служить модельной системой для изучения взаимодействия РНК-содержащих вирусов различных таксономических семейств в условиях смешанной инфекции.

Материалы работы могут быть использованы при подготовке студентов и аспирантов.

Личный вклад соискателя. Формирование целей и задач выполнено совместно с научными руководителями. Лично диссертантом подобраны методы исследования, проведены все исследования и анализ результатов, изложенных в диссертации. Соавторами осуществлялась консультативно-методическая помощь при проведении исследований. Диссертация написана лично автором с использованием собственных результатов.

Апробация работы. Результаты работы доложены на научной сессии Дальневосточного отделения РАСХН, посвященной 70-летию Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института (г. Благовещенск, 2005), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко Россельхозакадемии (г. Москва, 2006 г.), доложены на ученом совете

ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко в 2005г., 2014 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 4 научные работы, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 114 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований), выводы, список использованной литературы (который включает 261 источник, в том числе 177 зарубежных авторов). Диссертация содержит 4 таблицы, иллюстрирована 35 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Цитологическая характеристика клеток перевиваемой линии ЛЭК-ВИЭВ-90.
- Цитогенетическая характеристика клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV.
- Морфогенез вируса лейкоза крупного рогатого скота в культурах клеток естественно восприимчивого и гетерологичного вида животных.
- Антиген продуцирующая активность клеточной линии ЛЭК-ВИЭВ-90 в сравнении с клеточной линией FLK-BLV.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Исследования выполнены в лабораториях лейкозологии и биофизики Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко в период 2002 – 2014 гг.

В работе использовали две линии перевиваемых клеток, хронически инфицированных ВЛКРС.

FLK-BLV - линия клеток почки эмбриона овцы (fetal lamb kidney), получена в США Van der Maaten M.J. и Miller J.M. (1976). Культура была

получена в ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко от Van der Maaten и на протяжении большого количества пассажей сохраняла вирус-продуцирующую способность.

ЛЭК-ВИЭВ-90 - линия клеток легкого эмбриона коровы, получена в СССР (М.И. Гулюкин и соавт., 1992). Культура получена из криобанка ВИЭВ после длительного хранения (более 14 лет) при температуре -196°C (в жидком азоте).

Культивирование обеих культур проводили по общепринятым методикам с последующим приготовлением цитологических препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином.

Для культивирования использовали среды Игла MEM или Игла DMEM с добавлением 10% сыворотки эмбриона коровы, пеницилина-100 ед/мл, стрептомицина-100 мкг/мл. методике

Приготовление препаратов хромосом проводили по методу Мурхеда (1960), который предусматривает накопление в культуре клеток с помощью колхицина метафазных пластинок, обработку клеток гипотоническим раствором, фиксацию препаратов и их окрашивание.

Оценку продуцирования антигена ВЛ КРС клеточными культурами FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 проводили реакцией иммунодиффузии в агаровом геле. Выделение антигена из культуральной жидкости проводили методом преципитации его полиэтиленгликолем (м.м.6000).

Электронно - микроскопические исследования проводили с помощью приготовления ультратонких срезов с последующим изучением их на электронном микроскопе марок JEM-100 B и JEM-100 C (JEOL, Япония) при инструментальном увеличении от 3000 до 100 000.

ПЦР - исследования для выявления геномов вирусов лейкоза и диареи крупного рогатого скота проводили тест-системами «ЛЕЙКОЗ» для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота и «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва. Все этапы постановки

полимеразной цепной реакции проводили согласно инструкций, рекомендованных к тест-системам организации-производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культурально-морфологические свойства культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ 90

После 14-летнего хранения была восстановлена культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90. Жизнеспособность на 0 пассаже составляла 81%. На первом пассаже после восстановления, монослой был сформирован на 4 сутки культивирования. Через 3-4 пассажа культура клеток стабильно пересеивалась с индексом пролиферации 4,2-4,8. Рост культуры начинался с прикрепления клеток и их распластывания через 4-5 часов после высева в виде отдельных островков. На вторые сутки культивирования зарост культуры достигал 40-60%. При этом клетки имели округлую или многоугольную форму. В течение первых 1-2 суток культивирования клетки росли в виде отдельных, равномерно распределенных по всей площади матраса островков, имевших очертания неправильной формы.

Монослой формировался на 70-80% на 3 сутки культивирования при посевной концентрации 80-100 тыс.кл./мл. К концу третьих, началу четвертых суток культивирования клетки сливались, образуя ровный плотный монослой, к концу 4-х суток достигал полного 100%-ного зароста.

Далее к 120- часам культивирования в монослое отмечали отдельные плотные клетки, свидетельствующие о начале дегенеративных изменений в монослое.

Цитологический анализ культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 проводили на разных пассажах и сутках культивирования. Для этого суспензию клеток в концентрации 80-100 тыс.кл./мл вносили в пенициллиновые флаконы со стеклом. Клетки на стеклах с выросшим монослоем фиксировали через 24, 48, 72, 96, 120 часов, а затем окрашивали гематоксилин-эозином.

Культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 на разных пассажах имела одинаковую

морфологию и состояла из эпителиоподобных клеток и небольшого количества фибробластоподобных клеток. На цитологических препаратах клетки эпителиоподобного типа имели, в основном, полигональную форму, росли обычно в один слой без напластывания (Рис.1). Границы клеток были хорошо выражены и формировали сплошной монослой. В равномерном монослое ядра клеток были округлой, реже овальной формы с четко ограниченной оболочкой ядра. Структура ядра имела мелкосетчатую гранулярную структуру.

Ядра эпителиоподобных клеток более плотно окрашивались, чем у фибробластоподобных. Они были крупными, имели овальную, реже округлую форму и содержали от 1 до 4 ядрышек. Некоторые ядра клеток имели одно крупное ядрышко, округлой, угловатой или неопределенной формы, которое, как правило, лежало в центре ядра. Число таких ядер (содержащих одно ядрышко) достигало 30-40%, примерно 20-30% имело по 2 ядрышка, а в остальных - от 3 до 4. Расположение ядрышек в этих случаях либо эксцентричное, либо неопределенное.

Очень редко (0,02-0,05 %) встречались гигантские клетки с одним или несколькими ядрами, в которых было множество ядрышек.

В некоторых клетках наблюдали обильную вакуолизацию цитоплазмы, приводящую в дальнейшем к гибели клетки. Встречались и симпласты – клетки, содержащие более 2-4-х ядер, их число не превышало 0,04 %, также встречались клетки с бобовидной формой ядра.

Линия клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 сохраняла устойчивые культуральные свойства на уровне 100-150 пассажей (период наблюдений).

Для изучения митотической активности культуру клеток высевали в концентрации 80-100 тыс.кл./мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Через 1, 2, 3, 4 сутки культивирования извлекали стекла с культурой, фиксировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Подсчитывали число митозов на 1000 клеток (промилле - ‰). Высокая митотическая активность отмечалась через 48 часов культивирования и

составляла 28-32‰. В дальнейшем, при формировании монослоя через 96 часов культивирования наблюдали снижение митотической активности до 4-6‰.

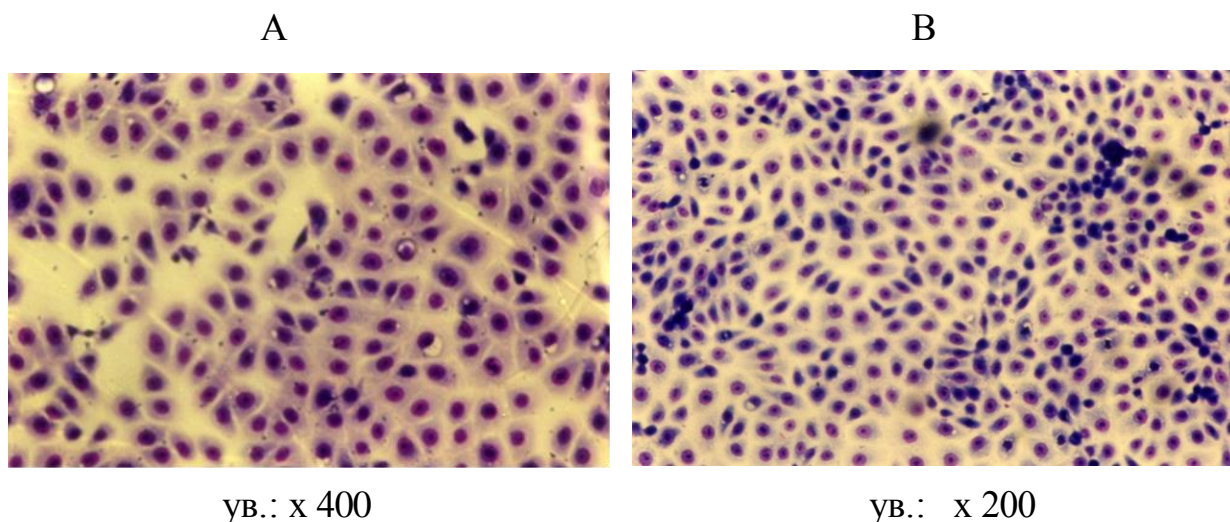


Рис. 1 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: А 72 часа культивирования, В 96 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином

Культурально-морфологические свойства культуры клеток FLK-BLV

После хранения в жидком азоте культуры клеток FLK-BLV жизнеспособность на 0 пассаже составляла 90%. На первом пассаже монослой был сформирован на 4 сутки культивирования. Первый пересев был проведен с коэффициентом посева 1:2, второй с коэффициентом 1:3. Через 3-4 пассажа культура клеток стабильно пересевалась с индексом пролиферации 2,8-3,9.

Рост культуры FLK-BLV начинался с прикрепления клеток и их распластывания по поверхности матраса. При этом отмечалось большое разнообразие в форме клеток, направлении и количестве цитоплазматических отростков.

Через 5-6 часов после высева зарост составлял 15-25% в виде отдельных островков и клеток. На вторые сутки культивирования зарост культуры достигал 40-50%, на 3 сутки составлял 70-80%. С течением срока культивирования в культуре все более преобладали вытянутые клетки. К 4 суткам культивирования культура представляла собой очень плотный

клеточный монослой.

Далее на 5-6 сутки культивирования культуры в монослое выявлялись плотные клетки с трудно различимым ядром, что свидетельствовало о начале дегенерации клеток.

Цитологический анализ культуры клеток FLK-BLV проводили на разных пассажах и сутках культивирования. Для этого суспензию клеток в концентрации 80-100 тыс.кл./мл вносили в пенициллиновые флаконы со стеклом. Стекла с выросшим монослоем фиксировали через 24, 48, 72, 96, 120 часов, а затем окрашивали гематоксилин-эозином.

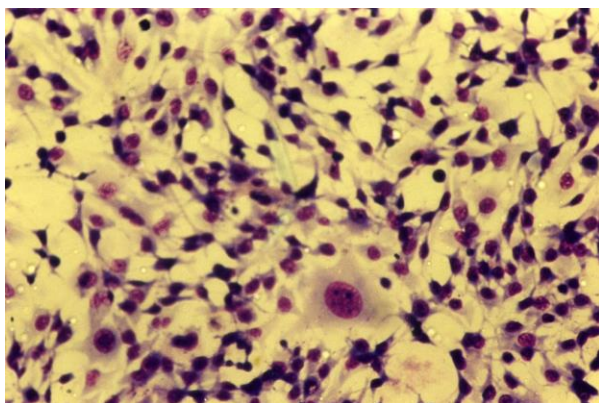
На цитологических препаратах культура клеток представлена клетками фибробластоподобного типа и небольшого количества клеток эпителиоподобного типа (Рис. 2). Эпителиоподобные клетки были полигональной формы с округлым плотным ядром. Фибробластоподобные клетки имели вытянутую веретеновидную форму, реже округлую, либо вытянутую с неравномерными выступами. Ядерный матрикс у фибробластов в монослое при окраске гематоксилином равномерный, мелкозернистый. Большинство клеток содержали центрально расположенное ядро овальной формы, в котором различали от 1 до 4 ядрышек.

Ядрышки обычно были некрупными, округлыми или неопределенной формы и неупорядоченно распределены по ядерному матриксу. В многослойных напластованиях ядра были относительно мелкими, их матрикс был интенсивно окрашен и ядрышки были трудно различимы. Цитоплазма клеток окрашивалась равномерно, была слабо эозинофильна, имела зернистую структуру.

Границы клеток плохо различимы, клетки в монослое взаимно переплетались цитоплазматическими отростками. Среди клеток культуры встречались гигантские клетки с одним большим ядром и вакуолизированной цитоплазмой (Рис. 2 А). Их количество составляло 0,3-0,5%. Встречались и симпласты – клетки, содержащие более 2-4-х ядер, их число не превышало 0,07 %.

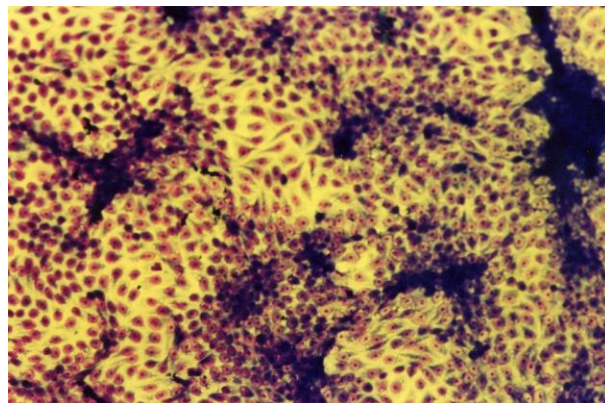
Для изучения митотической активности культуру клеток высевали в концентрации 80-100 тыс.кл./мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Через 1, 2, 3, 4 сутки культивирования извлекали стекла с культурой, фиксировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Подсчитывали число митозов на 1000 клеток (промилле - ‰). Высокая митотическая активность отмечалась через 48 часов культивирования и составляла 22-31‰. В дальнейшем, при формировании монослоя наблюдали снижение митотической активности до 3-6‰ через 96 часов культивирования.

А



ув.: x 400

В



ув.: x 200

Рис. 2 Клетки линии FLK-BLV: А 72 часов культивирования, В 96 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином

Цитогенетические исследования перевиваемых культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

Проведенные цитогенетические исследования показали, что у культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 интервал изменчивости хромосом составлял от 18 до 65 хромосом, модальный класс представлен 52 хромосомами и составляет 55% от общего числа, что соответствует диплоидному набору хромосом крупного рогатого скота, равный 60 хромосомам.

У FLK-BLV интервал изменчивости хромосом составил от 30 до 50, модальный класс представлен 50 хромосомами и составляет 37% от их общего количества, что соответствует диплоидному набору хромосом овцы,

равный 54 хромосомам.

Определение наличия антигена и генома ВЛ КРС в культурах клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

При исследовании продукции гликопротеидного антигена вируса лейкоза культурами ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV реакцией иммунодиффузии в геле были выявлены положительные результаты.

Титры антигена gp51 составляли в среднем для культур FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 $3,5 \log_2$ и $2,5 \log_2$, соответственно. За период наблюдений выход антигена gp51 для культуры FLK-BLV был выше, по сравнению с культурой ЛЭК-ВИЭВ-90, в среднем в 2 раза. При учете результатов во всех исследованных пробах культур клеток на 1, 2, 3, 4 и 5 дни пассажа (Рис. 3 А, В, трек 5-9, 1-5 дни пассажей) были получены положительные результаты, которые учитывались по наличию в них специфических светящихся полос на уровнях 294 п.н. и 582 п.н.

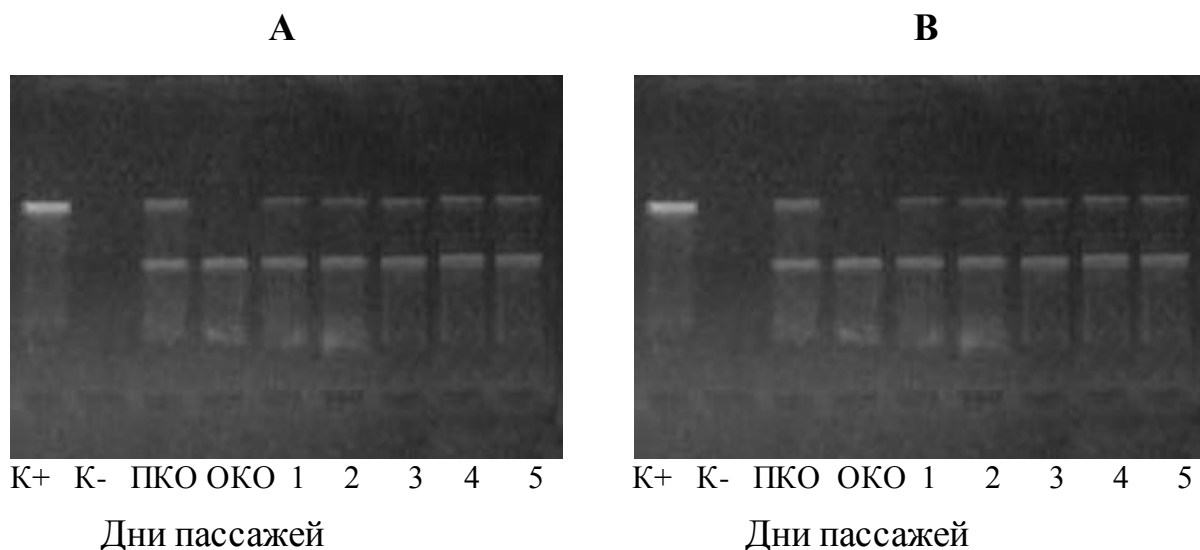


Рис. 3 Результаты исследования методом ПЦР культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 (А) и FLK-BLV (В) на 1,2,3,4 и 5 дни пассажа

Электронно-микроскопическая характеристика перевиваемых культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

При ультраструктурном исследовании клеток линий FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 были отмечены основные морфологические признаки каждой

культуры, что были выявлены на световом уровне. Дополнительно были получены следующие характеристики.

Ядра клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90 имели неровные границы, образующие иногда ядерные «карманы» (Рис.4 А).

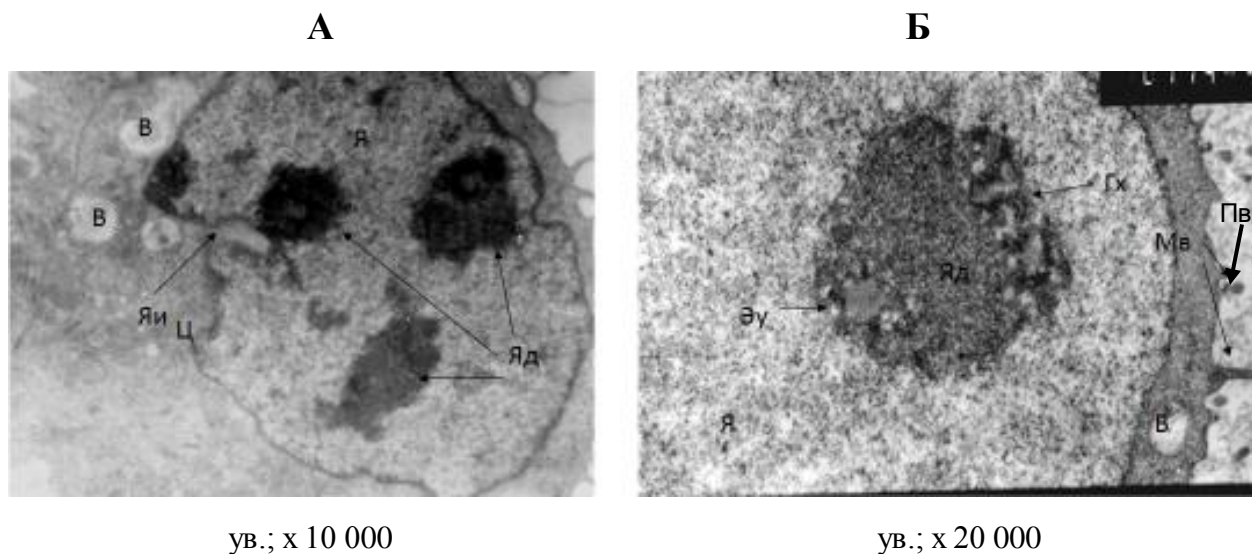


Рис. 4 (А, Б) Ультратонкий срез клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90

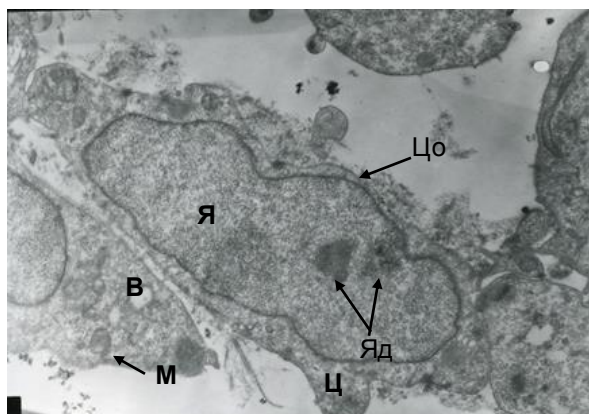
Я-ядро, Яд – ядрышко, Ц – цитоплазма, Яи - ядерный инвагинат (карман), В – цитоплазматическая вакуоль, Мв - микроворсинки, Эу, Гх - Эу и Гетерохроматин, Пв – почкование вириона

Внутри ядра располагались ядрышки разного количества от 1 до 4. В ядрышках был хорошо различим эу- и гетерохроматин (Рис. 4 Б). В цитоплазме отмечали обильное развитие шероховатого эндоплазматического ретикулума. Митохондрии клеток отличались значительной вариабельностью и плотностью, небольшими размерами и сильно увеличенным матриксом, количество крист также значительно варьировало. Они были окружена двумя митохондриальными мембранами наружной и внутренней. Внутренняя мембрана митохондрий образовывала многочисленные гребневидные складки крист. Во многих клетках выявлялись значительные изменения митохондрий, которые характеризовались разрушением и лизисом матрикса и крист. Отдельные митохондрии представляли собой вакуоли с электроннопрозрачным содержимым, оболочка их при этом сохранялась. В цитоплазме клеток выявлялось много везикулярных структур, разветвленная система субмикроскопических канальцев, трубочек и цистерн, ограниченных

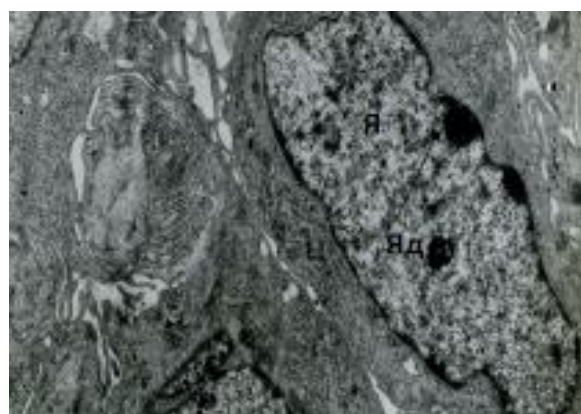
мембранами, а также электронноплотные тела. Комплекс Гольджи представлен классическими ламинарными структурами, часто заканчивающимися визикулярными структурами и различного размера вакуолями. Межклеточные контакты представляли собой тесный контакт цитоплазматических оболочек или переплетение микроотростков в виде замков.

Клеточный центр в обеих культурах выявляли редко; он представлял собой зону, состоящую из продольных и поперечных срезов микрофибрилл центриолей, от которых отходят микротрубочки.

В клетках линии FLK-BLV часть фибробластоподобных клеток была бедна цитоплазматическими органеллами. Ядра имели, в основном, вытянутую форму с неровными границами, содержали небольшое количество пристеночно расположенного эу- и гетерохроматина, внутри ядра располагались от 1 до 4 ядрышек (Рис. 5).



ув.; x 8000



ув.: x 8000

Рис. 5 Ультратонкий срез клеток линии FLK-BLV

Цо – цитоплазматическая оболочка, Я – ядро, Яд – ядрышко, Ц – цитоплазма, Цо – цитоплазматическая оболочка, М – митохондрии, В – цитоплазматическая вакуоль

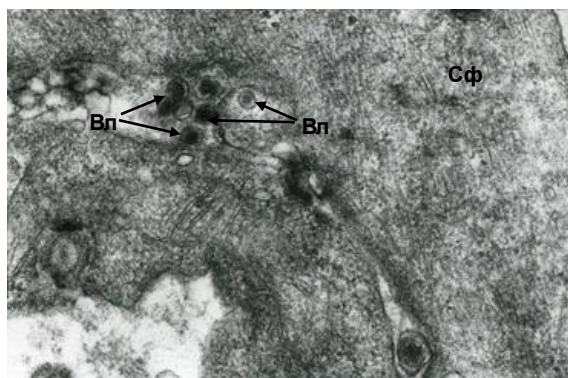
В отличие от клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90 в матриксе цитоплазмы диффузно располагались обильные скопления тонких фибрилл, группировавшихся пучками, и рибосомо-пластинчатые комплексы, которые имели различную форму (Рис. 6 А).

В обеих культурах в цитоплазме вируспродуцирующих клеток встречались

вакуоли, несущие вирионы типа С различной степени зрелости.

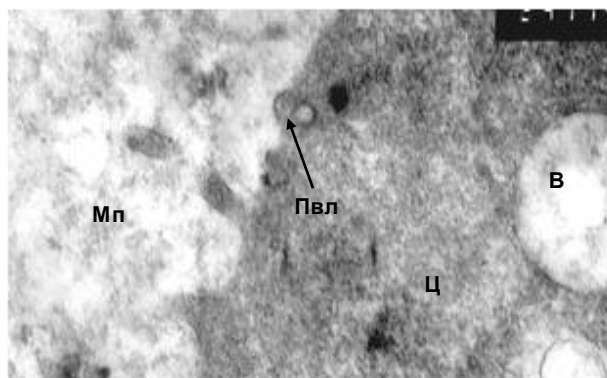
На клеточной мембране встречались почкующиеся формы вируса (Рис. 6 В), а рядом во внеклеточном пространстве скопления зрелых вирионов типа С. Они имели, в основном, эллипсоидную форму, содержали электронноплотный нуклеоид, окруженный оболочкой. Между оболочкой и нуклеоидом выделялась электроннопрозрачная зона (Рис. 7 Б).

А FLK-BLV



ув.: x 75 000

В ЛЭК-ВИЭВ-90



ув.: x 43 000

Рис. 6 (А,В) Ультратонкий срез клетки линии FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90
Пвл – почкование вирус лейкоза, Вл – вирус лейкоза, В - цитоплазматическая вакуоль, Мп – межклеточное пространство, Ц – цитоплазма, Сф – скопление фибрилл

Вируспродуцирующие клетки отличались большим количеством митохондрий, часто гипертрофированных, увеличением профилей гранулярного эндоплазматического ретикулума и появлением разнообразных рибосомо-пластинчатых комплексов. Некрозу подвергались некоторые вируспродуцирующие клетки, в вакуолях которых встречались электронноплотные нуклеоидоподобные частицы и цельные вирионы типа С. В этих клетках наблюдали обильную вакуолизацию, разрушение органелл и цитоплазмы.

Морфология и пути морфогенеза вируса лейкоза крупного рогатого скота в культурах FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90

В обеих исследованных культурах клеток вирионы располагались, в основном, в цитоплазматических вакуолях и во внеклеточном пространстве непосредственно рядом с плазмалеммой и были с характерной для

лейковирусов сходной морфологией типа С.

Вирионы были различных размеров и имели эллипсоидную, сферическую, вытянутую и иногда гантелевидную форму. Они содержали центрально расположенный электронно-плотный нуклеоид диаметром 50-90 нм, окруженный оболочкой. Между оболочкой и нуклеоидом выделялась электронно-прозрачная зона варьирующего размера. Её размер составлял в среднем 8-16 нм, а полный диаметр вирионов варьировал от 80 до 120 нм (Рис. 7 А, В).

Выраженная гетерогенность вирионов по форме и размерам была особенно характерна для внутриклеточного вируса, расположенного в цитоплазматических вакуолях.

Встречались вакуоли с множеством нуклеоидоподобных частиц, а в других можно было наблюдать вирионы различной степени зрелости. Такие скопления располагались в цитоплазме и были окружены общей мембраной. Во внутриклеточных вакуолях кроме вирусных частиц располагались небольшие сферические образования, мембранные структуры, аморфные скопления с различной электронной плотностью.

Во внеклеточном пространстве встречались только зрелые вирионы, которые располагались чаще группами среди мембранных и других клеточных структур, их форма была более стабильна.

По всей толще цитоплазмы располагались вируснесущие вакуоли и в местах их соприкосновения с плазмалеммой клеток наблюдались ее разрывы, через которые зрелые вирионы выходили из клетки. Внеклеточно располагались только зрелые вирионы, которые имели все характерные признаки ретровирусных частиц типа С.

Почкующиеся формы вирионов ВЛ КРС в исследуемых культурах обнаруживали редко, процесс почкования проходил традиционным путем. Процесс образования почки начинался конденсацией электронно-плотного материала под клеточной оболочкой. Происходило выпячивание конденсата с закруглением его концевых участков до полного их соединения.

Покрывающая его цитоплазматическая мембрана также претерпевала значительные изменения, превращаясь в оболочку вириона. Она постепенно закруглялась, и на поздних стадиях формирования почки образующийся вирион был связан с клеткой лишь тонким цитоплазматическим мостиком (Рис. 7Б). Почкующиеся формы вируса отличались стабильностью размера и формы вирионов.

В обеих изученных клетках культур, хронически инфицированных вирусом лейкоза, имеющих различное видовое происхождение, наблюдали вирус различной степени зрелости. Морфология продуцируемого ими онкорнавируса была идентична. Она также была идентична морфологии вируса, описываемого в литературе как вирус лейкоза крупного рогатого скота (Рис. 7).

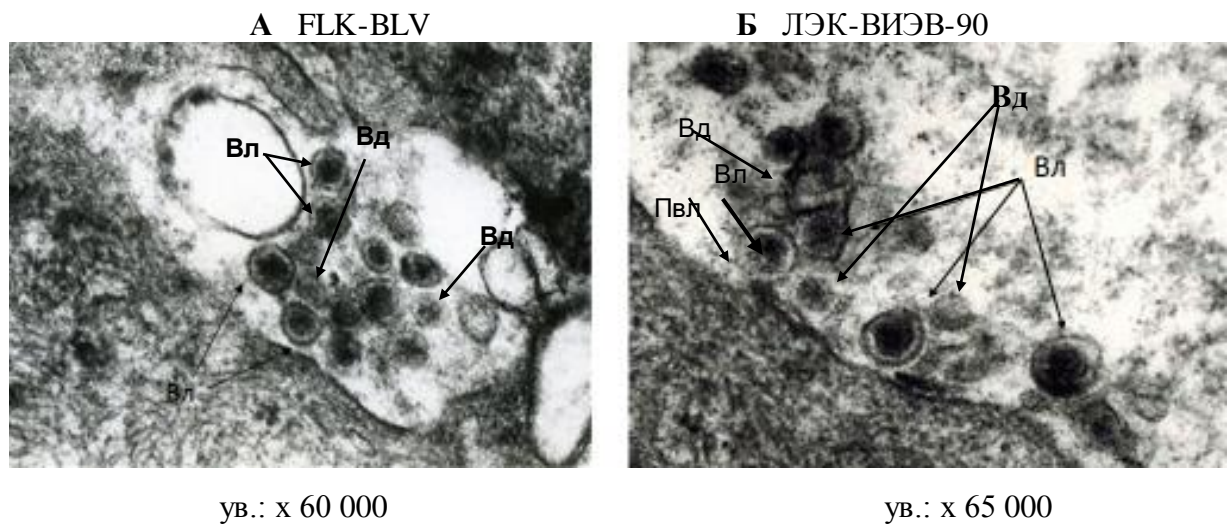


Рис. 7 (А,Б) Ультратонкие срезы клеток линий FLK – BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90

Вл – вирус лейкоза крупного рогатого скота, Пвл – почкование вируса лейкоза, Вд – вирус диареи крупного рогатого скота

В культуре клеток FLK-BLV количество зрелых вирионов было выше, чем в клетках культуры ЛЭК-ВИЭВ-90. Формирование вируса лейкоза крупного рогатого скота происходило в процессе почкования традиционным путем, вирионы выявлялись в основном сформированными в цитоплазматических вакуолях и во внеклеточном пространстве.

В ультратонких срезах обеих клетках культур помимо вируса лейкоза

наблюдали частицы, отличающиеся размером и структурой от ВЛ КРС. Их размер колебался от 40 до 60 нм, частицы не имели выраженного электронноплотного ядра и чаще были с аморфным содержимым. Они располагались как внутри клеток, так и в межклеточном пространстве, по морфологии были похожи на вирус диареи КРС (Рис. 7, 8).

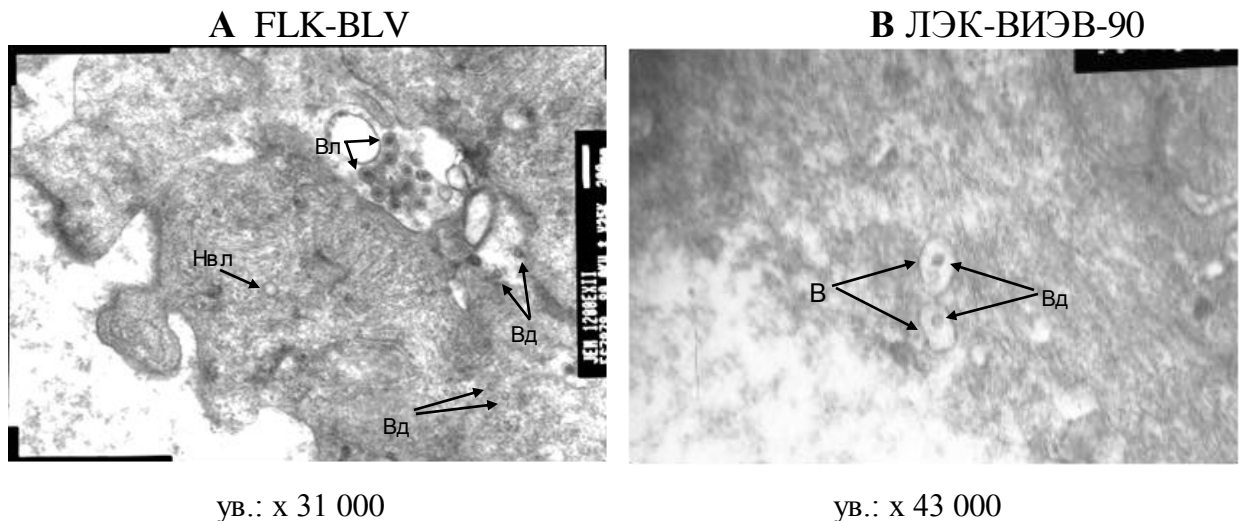


Рис. 8 (А, В) Ультратонкие срезы клеток линий FLK – BLV Вл – вирус лейкоза крупного рогатого скота, Нвл – нуклеоид вируса лейкоза, Вд – вирус диареи КРС

Определение наличия генома вируса диареи КРС методом ПЦР в культурах клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

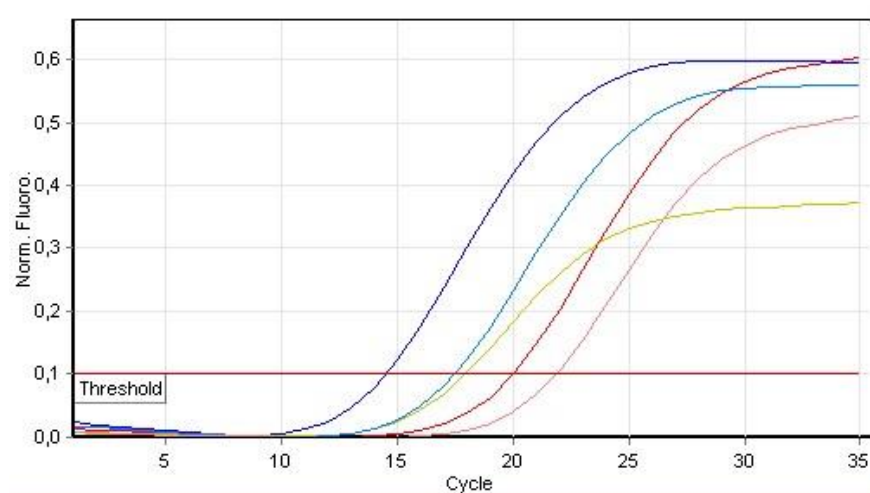
Так как при проведении электронной микроскопии культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV помимо вируса лейкоза были обнаружены вирионы, по морфологии схожие с вирусом диареи крупного рогатого, мы провели дополнительные исследования данных культур методом «Real-time PCR» на наличие генома вируса диареи КРС.

На графике 1 представлены результаты исследования культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV методом ПЦР с гибридационн-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Полученные в ходе эксперимента данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала – анализировали с помощью программного обеспечения «RotorGene 6.0». Результаты реакции интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с

установленной на соответствующем уровне пороговой линией (Threshold) в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в таблице результатов.

Анализ кинетических кривых по каналу детекции FAM показал, что значение Ct определено для положительного контроля амплификации (21,85), положительного контроля этапа выделения (17,47), для пробы №1 с культурой клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 (19,99) и для пробы №2 с культурой клеток FLK-BLV (17,92), что свидетельствует о положительных результатах этих проб, т.е. о выделении генома вируса диареи крупного рогатого скота (Рис.9).



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	Rep. Ct
1	■	1	Unknown	19,99			19,99
2	■	2	Unknown	17,92			17,92
3	■	3	Unknown	14,53			14,53
4	■	4	Unknown	NEG (R.Eff)			
5	■	к- выделение РНК	Unknown	NEG (R.Eff)			
6	■	к+ выделение РНК	Unknown	17,47			17,47
7	■	к-ПЦР	Unknown	NEG (R.Eff)			
8	■	к+ПЦР	Unknown	21,85			21,85

Рис. 9 – Результаты исследования культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (Real-Time PCR) на геном вируса диареи КРС: проба №1 - культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90, проба №2 - культура клеток FLK-BLV, проба №5 - отрицательный контроль этапа выделения РНК, проба №6 -положительный контроль этапа выделения РНК, проба №7 - отрицательный контроль этапа амплификации, проба №8 - положительный контроль этапа амплификации.

ВЫВОДЫ

1. Культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 представлена клетками эпителиоподобного типа полигональной формы с небольшим количеством фибробластоподобных клеток, а FLK-BLV полигональными клетками с преобладанием фибробластоподобных. Ядра в обеих культурах одинаковой формы и с количеством ядрышек от одного до четырех. По кариологической характеристике культура ЛЭК-ВИЭВ-90 имеет 52 хромосомы с интервалом изменчивости от 18 до 65 хромосом, культура клеток FLK-BLV имеет 50 хромосом, с интервалом изменчивости от 30 до 50 хромосом. По ультраструктурной характеристике клетки обеих культур аналогичны, и они обладают всеми типичными органеллами.

2. В цитоплазме клеток культур ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV выявляются вирионы типа С, на срезе они представляют собой округлые структуры диаметром от 80 до 120 нм, имеют двухслойную наружную оболочку, центрально расположенный плотный нуклеоид диаметром от 50 до 90 нм и электроннопрозрачную зону между ними. Аналогичные вирионы выявляются также в межклеточном пространстве. По морфологии вирус является типичным вирусом лейкоза КРС.

3. Формирование вируса лейкоза КРС происходит почкованием от цитоплазматической оболочки, однако морфологические доказательства этого процесса выявляются в ультратонких срезах крайне редко. Вирионы выявляются в основном сформированными в цитоплазматических вакуолях и во внеклеточном пространстве. В клетках культуры ЛЭК-ВИЭВ-90 вирионы выявляются существенно реже, чем в клетках FLK-BLV.

4. Сравнительный анализ количества антигена gp51, продуцируемого этими культурами клеток методом иммунодиффузии в агаровом геле, показал, что культура FLK-BLV продуцирует антигена в 2,5 раза больше, чем культура ЛЭК-ВИЭВ-90. Это коррелирует с данными электронной микроскопии.

5. Цитоплазма клеток культур ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV содержит также вирионы, отличные от вируса лейкоза КРС. Они имеют округлую форму около 60 нм, внутреннее содержимое их выявляется в виде аморфной структуры. Морфогенез данного вируса связан со структурными компонентами цитоплазматического ретикулула; по морфологическим свойствам выявленный вирус аналогичен вирусу диареи крупного рогатого скота. Эти данные подтверждаются результатами, полученными методом ПЦР, который показал наличие генома вируса диареи КРС в обеих культурах.

6. Сравнительный анализ показал, что перевиваемая клеточная культура ЛЭК-ВИЭВ-90 может использоваться для производства антигена gp51 вируса лейкоза генотипа, циркулирующего в поголовье крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, как альтернатива американскому генотипу вируса, продуцирующегося в культуре FLK-BLV.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Перевиваемая клеточная культура ЛЭК-ВИЭВ-90 рекомендуется для производства в промышленном масштабе антигена gp51 вируса лейкоза, циркулирующего в поголовье крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, как альтернатива американскому генотипу вируса, продуцирующегося в культуре FLK-BLV.

В связи с контаминацией вирусом диареи клеточных культур FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 при использовании их для производства антигенов gp51 и p24 для диагностических наборов, положительную контрольную сыворотку к вирусу лейкоза обязательно контролировать на отсутствие в ней антител к вирусу диареи.

Клеточные линии FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 рекомендуются в качестве лабораторной модели для изучения взаимодействия неродственных РНК геномных вирусов в условиях смешанной инфекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Вангели С.В.** Культурально-морфологические и цитологические свойства культур клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК-ВИЭВ-90) и эмбриона почки овцы (FLK-BLV), хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота / С.В. Вангели // Сборник научных трудов, посвященный 70-летию ДальЗНИВИ. - 2005. - С. 74-77.
2. Электронно-микроскопические исследования культур клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК-ВИЭВ-90) и эмбриона почки овцы (FLK-BLV), хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота / **С.В. Вангели**, М.И. Гулюкин, Г.А. Надточей // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: Материалы международной научно-практической конференции. - 2006. - С. 172-175.
3. Характеристика перевиваемых культур клеток, хронически инфицированных ВЛ КРС FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 / **С.В. Вангели**, М.И. Гулюкин, Г.А. Надточей, Л.А. Иванова, О.Н. Рудакова // Ветеринария. - 2007. - № 10. - С. 50-52.
4. **Вангели С.В.** Сравнительная морфологическая характеристика клеточных линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота / С.В. Вангели // Ветеринария и Кормление. – 2015. – № 1. – С. 19-22.

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям М.И. Гулюкину и Г.А. Надточему, а также к.б.н. Т.В. Гальнбек, к.б.н. Л.А. Ивановой, к.б.н. А.С. Малоголовкину за ценные консультации, контроль, сопровождение данной диссертационной работы и моральную поддержку.