

# ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ В КЛЕТКАХ ЯДК-04 ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ВИРУСОМ ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

**Б. Л. Манин<sup>1</sup>, Л. В. Малахова<sup>2</sup>, А. Б. Сарбасов<sup>3</sup>, Н. В. Мороз<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: manin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5263-1491

<sup>2</sup> Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир; e-mail: burdeynaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-8011-5657

<sup>3</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: sarbasov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1742-7989

<sup>4</sup> Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: moroz@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-9672-8594

## РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты экспериментальных исследований цитопатического действия вируса чумы мелких жвачных животных на перевиваемую культуру клеток яичников домашней козы (ЯДК-04). С помощью комбинированного применения фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии показано взаимодействие вируса чумы мелких жвачных животных с клетками на разных стадиях его репродукции. Было выявлено, что на начальной стадии взаимодействия (20–24 ч) происходит округление и деадгезирование клеток и частичное разрыхление монослоя. На вторые сутки репродукции основная часть культурального монослоя, пораженная вирусом, начинает разрушаться, внутри клеток происходит смещение ядер к периферии. В терминальной стадии (72 ч) происходит разрушение клеток монослоя и цитоплазматического матрикса, деформация и частичный лизис ядер и цитоплазмы, агрегация детрита. На конечной стадии репродукции (96 ч) вирус чумы мелких жвачных животных диффундирует в среду культивирования, флуоресценция в желтом спектре значительно уменьшается, но титр вируса достигает  $6,89 \text{ Ig TCD}_{50}/\text{cm}^3$ .

**Ключевые слова:** культура клеток ЯДК-04, вирус чумы мелких жвачных животных, цитопатическое действие, люминесцентная и фазово-контрастная микроскопия.

# CYTOMORPHOLOGICAL TRANSFORMATIONS IN YADK-04 CELLS DURING INTERACTION WITH PESTE DE PETITS RUMINANTS VIRUS

**B. L. Manin<sup>1</sup>, L. V. Malakhova<sup>2</sup>, A. B. Sarbasov<sup>3</sup>, N. V. Moroz<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: manin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5263-1491

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; e-mail: burdeynaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-8011-5657

<sup>3</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sarbasov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1742-7989

<sup>4</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: moroz@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-9672-8594

## SUMMARY

The paper presents experimental study results of the cytopathic effect of peste de petits ruminants virus on a goat gonad continuous cell line (YaDK-04). The interaction of peste de petits ruminants virus with cells at different stages of its reproduction was shown using a combination of phase-contrast and luminescent microscopy. It was found that at the initial stage of interaction (20–24 hours) the cells became rounded and de-adhered, and the monolayer was partially loosened. On day 2 post reproduction the most part of the culture monolayer affected by the virus began to destruct, and the cell nuclei were displaced to periphery. At the terminal stage (72 hours) the destruction of monolayer cells and cytoplasmic matrix, deformation and partial lysis of the nuclei and cytoplasm, aggregation of detritus occurred. At the final stage of reproduction (96 hours) the peste de petits ruminants virus diffused into the culture medium, the fluorescence in the yellow spectrum decreased significantly, but the virus titer reached  $6.89 \text{ Ig TCD}_{50}/\text{cm}^3$ .

**Key words:** YaDC-04 cell culture, peste de petits ruminants virus, cytopathic effect, luminescent and phase-contrast microscopy.

## ВВЕДЕНИЕ

Важность изучения цитоморфологических изменений при взаимодействии вирусов с клеточными линиями *in vitro* имеет несколько аспектов, на первом месте стоят специфические морфологические трансформации, которые могут быть одним из ориентиров видовой принадлежности возбудителя. На основе специфики поражений клеток можно накапливать информацию о возможных поражениях отдельных тканей и органов у животных [1]. Немаловажно использовать специфику цитоморфологических изменений при отработке условий культивирования вирусов и проведении вирусологических исследований [5].

Вирус чумы мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) относится к семейству *Paramyxoviridae* и по культуральным свойствам сходен с вирусами оспы овец и оспы коз (репродукция вируса происходит на одних и тех же культурах и в одинаковых условиях), но отличается по цитопатическому действию на клетки [3, 6].

Целью работы было исследование взаимодействия вируса ЧМЖЖ с культурой клеток яичников домашней козы (ЯДК-04) с помощью люминесцентной и фазово-контрастной микроскопии и установление специфичности действия данного вируса на культуру клеток ЯДК-04.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусные материалы.** В работе использовали производственный штамм «ВНИИЗЖ» вируса ЧМЖЖ с инфекционной активностью  $5,89 \pm 0,18 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и производственный штамм «ВНИИЗЖ» вируса оспы овец с инфекционной активностью  $6,25 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

**Культура клеток.** Культивирование вирусов, использованных в работе, проводили в перевиваемой культуре клеток ЯДК-04. Температура инкубации нормальной и зараженной клеточной культуры составляла  $37,5-38,0^\circ\text{C}$ .

**Питательные среды и растворы.** В качестве ростовой среды для культуры клеток ЯДК-04 использовали смесь питательных сред ПСП (питательная среда пристеночная) и 199 в соотношении 2:1 с добавлением обработанной лантаноидами 10% сыворотки крови КРС (рН среды 7,0–7,2).

В качестве поддерживающей среды для вируса использовали питательную среду ПСП с 2% инактивированной при  $58^\circ\text{C}$  в течение 30 мин сыворотки крови КРС (рН 7,3–7,5). Перед внесением вируса монослой культуры клеток ЯДК-04 отмывали солевым раствором Хенкса с рН 7,1–7,2. Коррекцию рН среды в процессе

культивирования вируса проводили 7,5%-м раствором бикарбоната натрия.

Для предотвращения бактериального пророста питательных сред и раствора Хенкса добавляли антибиотики в общепринятой дозировке (100 ед./мл канамицина или 40 ед./мл гентамицина).

**Сосуды и аппараты.** Лабораторное культивирование клеток проводили во флаконах фирмы Corning (США) с площадью роста  $25 \text{ см}^2$ .

Цитоморфологические изменения в культуре при взаимодействии с вирусом изучали в фазовом контрасте на микроскопе Olympus CKX-41 при 100- и 200-кратном увеличении и люминесцентном микроскопе МЛ-2Б при увеличении в 100 и 200 крат. При люминесцентной микроскопии нативные препараты, выращенные на кровных стеклах, окрашивали 0,01% раствором акридинового оранжевого [4].

Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в  $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы, в настоящее время для культивирования вируса ЧМЖЖ используют первичные и перевиваемые культуры клеток [1, 3, 6]. К недостаткам выращивания вируса на первичных культурах клеток является достаточно трудоемкий процесс получения клеточного монослоя и возможная предшествующая обсемененность материала, используемого для трипсинизации. Поэтому для получения большого объема вирусного сырья перспективным и удобным являются перевиваемые клеточные линии, преимущество которых является возможность создания банка клеток с характеристиками, необходимыми для производства вакцин.

В ФГБУ «ВНИИЗЖ» разработана технология промышленного культивирования вируса ЧМЖЖ на перевиваемой культуре клеток ЯДК-04. Данная система культивирования позволяет получать вирусосодержащее сырье с высокой инфекционной активностью.

В рамках настоящего исследования определение количества вируса проводили в динамике с интервалом 24 ч методом титрования на культуре клеток ЯДК-04. Результаты представлены в таблице.

Данные таблицы показывают, что уровень накопления вируса ЧМЖЖ в процессе его выращивания повышается, достигая максимального значения к 96 ч культивирования ( $5,89 \pm 0,18 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ), с последующим снижением инфекционного титра до  $5,08 \pm 0,18 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  к 120 ч.

Образец вирусного материала с оптимальной инфекционной активностью (96 ч культивирования) был взят для проведения дальнейшей работы и достижения поставленной задачи исследований – изучение цитоморфологических изменений в клетках ЯДК-04 под действием вируса ЧМЖЖ.

Единогласного подхода к изучению взаимодействия вирусов с клеточными культурами нет. Исследователи применяют для этого самые различные методы. Наиболее известными являются методы с использованием радиоактивных меток, гистохимические, серологические, электронная микроскопия и др. [1, 2, 7]. Было изучено действие вируса ЧМЖЖ на морфологию монослоя и отдельных клеток постоянной линии ЯДК-04 в процессе их взаимодействия с помощью фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии.

**Таблица 1**  
Динамика накопления вируса ЧМЖЖ на перевиваемой культуре клеток ЯДК-04 ( $n = 3$ )

Время культивирования, ч	Титр вируса, $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
24	$3,08 \pm 0,14$
48	$4,25 \pm 0,00$
72	$5,33 \pm 0,18$
96	$5,89 \pm 0,18$
120	$5,08 \pm 0,18$

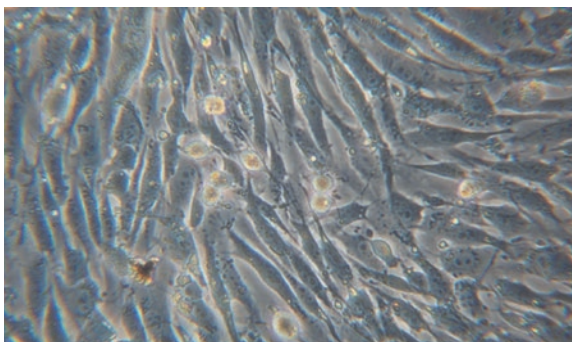


Рис. 1. Морфология клеток ЯДК-04 до контаминации вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 400$ )

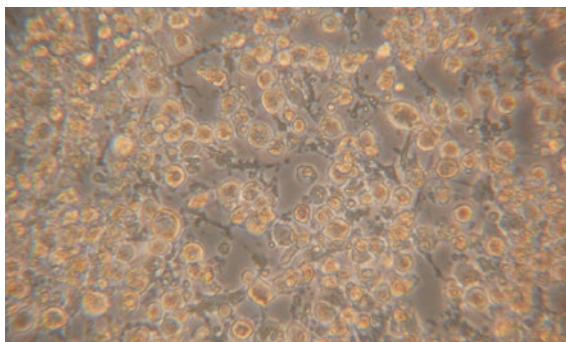


Рис. 2. Трансформация клеток ЯДК-04 через 48 ч после инфицирования вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 400$ )

Все вирусы являются внутриклеточными паразитами. После внедрения вируса в клетку происходит депротенизация его оболочек, репликация нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), синтез оболочек и сборка вирионов. Основные процессы репликации происходят в цитоплазме клеток, где вирусные частицы скапливаются чаще всего в диффузной конфигурации. В связи с тем, что вирус использует биоматериал клеток, происходят конформационные изменения всех органелл, цитоплазматического матрикса и ядра. Эти изменения внутри клеток в результате действия вируса ЧМЖЖ известны как оксиофильные или эозинофильные включения, глыбки, гранулы и т. д. [2, 6]. При проведении исследования с помощью окрашивания нативных препаратов и люминесцентной микроскопии удалось выяснить некоторые цитоморфологические изменения при репродукции вируса ЧМЖЖ в клеточной линии ЯДК-04.

Нормальная (интактная) морфология культуры клеток ЯДК-04 представлена большим количеством веретенообразных и небольшим количеством клеток типа фибробластов (рис. 1, 5). Делящиеся клетки имеют сферическую и продолговатую форму, а ядра – эллиптическую, которая соответствует морфологии всех клеток. Изучаемая культура клеток в конце логарифмической фазы роста имела минимальное количество делящихся клеток и значение рН 6,8.

Действие вируса ЧМЖЖ в первые сутки культивирования (20–24 ч) сопровождалось появлением округлившихся деадгезированных клеток. Максимальное их количество наблюдали через 48 ч (рис. 2, 6). Часть клеток агрегировала в сферические симпласты. В этот период пораженные клетки и мини-симпласты имели аморфные границы. Внутри клеток происходила спирализация хроматина ядер (кариопикноз). После

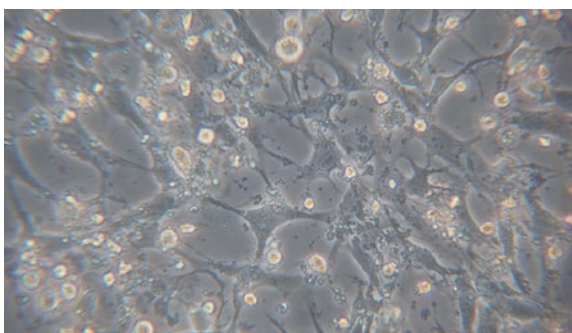


Рис. 3. Трансформация клеток ЯДК-04 через 72 ч после инфицирования вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 400$ )

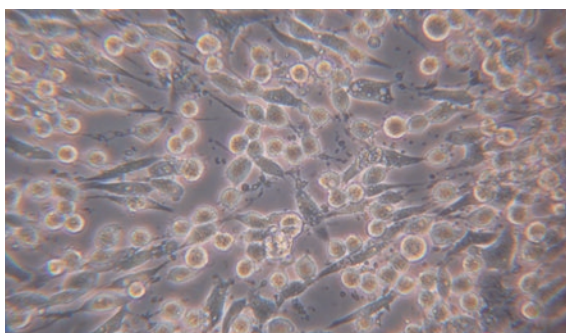


Рис. 4. Трансформация клеток ЯДК-04 через 72 ч после инфицирования вирусом оспы овец (увеличение  $\times 400$ )

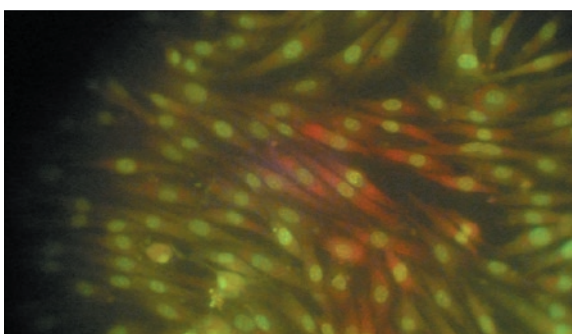


Рис. 5. Морфология клеток ЯДК-04 до контаминации вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 200$ ), люминесценция

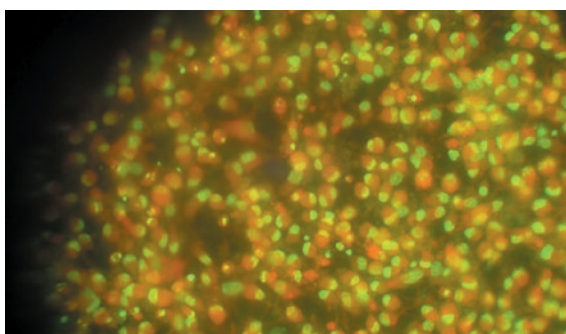


Рис. 6. Трансформация клеток ЯДК-04 через 48 ч после инфицирования вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 200$ ), люминесценция



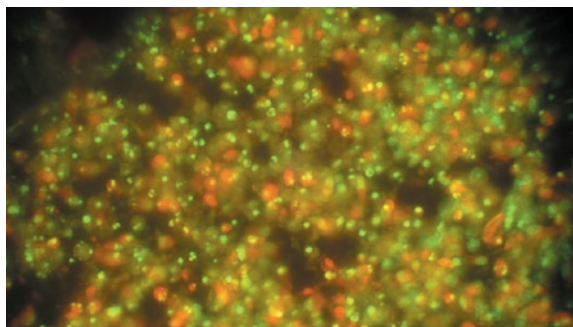


Рис. 7. Трансформация клеток ЯДК-04 через 72 ч после инфицирования вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 200$ ), люминесценция

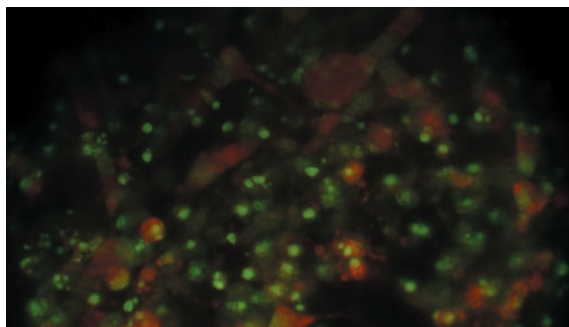


Рис. 8. Трансформация клеток ЯДК-04 через 72 ч после инфицирования вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 400$ ), люминесценция

уплотнения хроматина (усиление люминесценции в зеленой области спектра) ядра деформировались, приобретали серповидную форму и перемещались на периферию к одному из краев клеток. К этому сроку цитоплазма клеток еще сохраняла целостность и люминесцировала в оранжевой области, что характерно для концентратов РНК и соответствовало локализации РНК-содержащего вируса ЧМЖЖ (рис. 6).

На следующей стадии (через 72 ч) наблюдали лизис основной части пораженных клеток. Цитоплазма клеток вместе с вирусом диффундировали в питательную среду (рис. 3, 7). Ядра клеток с суперспирализованной РНК флуоресцировали в зеленой области и подвергались лизису в последнюю очередь (рис. 9). До конца цикла культивирования вируса на субстрате наблюдали 2–5% неразрушенных, но пораженных клеток (рис. 8, 9).

В некоторых исключительных случаях, в результате взаимодействия вируса ЧМЖЖ с культурой клеток ЯДК-04, образовались довольно крупные симпласты из нескольких десятков клеток, но они были сформированы на фоне непораженных участков монослоя и не вызывали тотального цитопатического действия. В крупных симпластах также происходили kariopikноз и фрагментация ядер (рис. 10). В терминальной стадии цитопатического действия вируса ЧМЖЖ наблюдали более чем 90%-й лизис клеточных мембран и диффузию содержимого цитоплазмы в питательную среду. При этом только пикнотические ядра и небольшое количество неразрушенных клеток контрастировались акридиновым оранжевым (рис. 8, 9). РНК-содержащий компонент цитоплазм (вероятно, вирусный) уже не окрашивался.

Все стадии репродукции вируса ЧМЖЖ основываются на преобразованиях вирусной РНК, которые первоначально проходят в клеточном ядре, а затем в цитоплазме зараженных клеток [1]. Наблюдаемые изменения в клеточной культуре происходили из-за усиления синтеза вирусной РНК в первые 24–48 ч. На рисунке 6 видно, что цитоплазма небольшой части зараженных вирусом клеток флуоресцировала оранжевым цветом, что говорит об увеличении количества вирусной РНК в цитоплазме и о начале синтеза вирусного белка. По данным литературы, в последующие часы вирусная РНК транспортируется в цитоплазму клеток, где на ней происходит синтез белка и последующая сборка вирусных частиц. К 72 ч культивирования оранжевое свечение в цитоплазме исчезает, так как вирусная РНК сразу же преобразуется в рибонуклеопротеид и затем покрывается вирусной оболочкой на мембранах клетки, одновременно лизируя их [7]. Это особенно хорошо было выражено к 72 ч после заражения. Поэтому в этот период культивирования также наблюдали лизис клеток, что соответствовало предмаксимальному накоплению вируса в культуре, хотя часть вируса еще находилась в составе клеток. Образование симпластов, характерное для вируса ЧМЖЖ, редко встречается при инфицировании клеток ЯДК-04 вирусом оспы овец [3]. На рисунке 4 представлена фотография зараженной вирусом оспы овец культуры клеток ЯДК-04 к 72 ч инкубации, где образования симпластов и лизиса клеток не наблюдали. Это связано с отсутствием в структуре вируса оспы овец белка слияния, который и вызывает лизис клеток и образование агрегатов и симпластов при инфекции ЧМЖЖ [1].

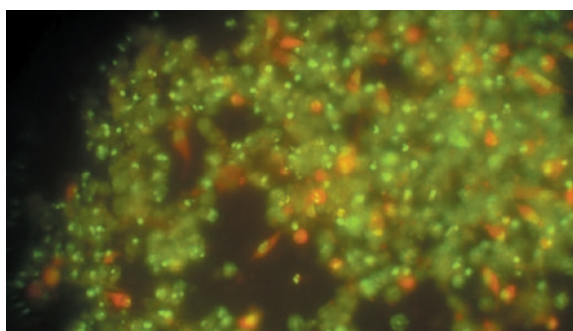


Рис. 9. Трансформация клеток ЯДК-04 через 96 ч после инфицирования вирусом ЧМЖЖ (увеличение  $\times 200$ ), люминесценция

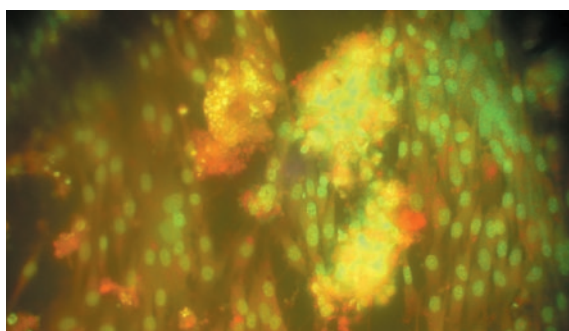


Рис. 10. Трансформация клеток ЯДК-04 через 72 ч после инфицирования вирусом ЧМЖЖ. Формирование симпластов (увеличение  $\times 200$ ), люминесценция

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение цитопатического действия вируса ЧМЖЖ на культуре клеток ЯДК-04 проводили в фазовом контрасте и методом люминесцентной микроскопии при окрашивании 0,01% раствором акридинового оранжевого.

Первоначально, исследовав динамику накопления вируса в культуре ЯДК-04 в течение 120 ч инкубации, было определено, что максимальное количество вируса образуется к 72–96 ч инкубации, а затем происходит снижение инфекционного титра.

Показано, что цитопатическое действие вируса ЧМЖЖ в различные сроки инкубации имеет признаки, характерные для вирусов этой группы, и отличается от подобного действия вируса оспы овец.

Применение люминесцентной и фазово-контрастной микроскопии позволило более детально показать морфологическую трансформацию в монослое и клетках ЯДК-04 в различные сроки инкубации вируса ЧМЖЖ. Эти изменения проявлялись последовательно. Сначала происходило округление клеток и их агрегация, потом деформация ядер внутри цитоплазмы и смещение их к периферии клеток, а затем – лизис основной части монослоя и выход содержимого цитоплазмы в среду. Оксифильные включения, наблюдаемые некоторыми исследователями в результате взаимодействия ЧМЖЖ с постоянными клеточными линиями, мы идентифицировали как ядра клеток, которые были смещены к периферии клеток и сильно уплотнены, в результате чего происходило их разрушение в вирусной суспензии.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 1998. – С. 236, 262.
2. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова; Рос. акад. с.-х. наук. – 2-е изд., доп. – М.: Спутник+, 2009. – 652 с.
3. Капускин Е. В. Оптимизация условий культивирования вируса чумы мелких жвачных для получения диагностических и вакцинных препаратов: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Владимир, 2008. – 25 с.

4. Методы культивирования клеток (сборник научных трудов) / отв. ред. Г. П. Пинаев. – Л.: Наука, 1988. – 319 с.

5. Роменская Д. В., Манин Т. Б., Манин Б. Л. Изучение цитоморфологических трансформаций клеточного монослоя Vero-V в зависимости от времени репродукции метапневмовируса птиц // Клеточные культуры: информ. бюл. – СПб., 2012. – Вып. 28. – С. 50–55.

6. Степанов А. В., Вишняков И. Ф., Стрижаков А. А. Персистенция вируса чумы мелких жвачных (ЧМЖ) в перевиваемых культурах клеток // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими зооантропонозными болезнями животных: сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2000. – С. 206–209.

7. Apoptosis induced by peste de petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells / B. Mondal, B. P. Sreenivasa, P. Dhar [et al.] // Virus Res. – 2001. – Vol. 73 (2). – P. 113–119; DOI: 10.1016/S0168-1702(00)00214-8.

## REFERENCES

1. Viral animal diseases [Virusnye bolezni zhivotnyh]. V. N. Syurin, A. Ya. Samuilenko, B. V. Solovyov, N. V. Fomina. M.: VNIITBP, 1998 (in Russian).
2. Animal cell in culture (methods and implementation in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (metody i primeneniye v biotekhnologii)]. Ed. by L. P. Dyakonova; Russian Academy of Agricultural Sciences. 2<sup>nd</sup> ed., enlarged. M.: Sputnik+, 2009 (in Russian).
3. Kapuskin Ye. V. Optimization of conditions of peste de petits ruminants virus cultivation for preparation of diagnostic kits and vaccines [Optimizatsiya usloviy kul'tivirovaniya virusa chумы melkih zhvachnyh dlya polucheniya diagnosticheskikh i vaktsinnykh preparatov]: author's abstract. ... Candidate of Science (Veterinary Medicine). Vladimir, 2008 (in Russian).
4. Cell cultivation methods (science proceedings) [Metody kul'tivirovaniya kletok (sbornik nauchnykh trudov)]. Ed.-in-chief. G. P. Pinayev. L.: Nauka, 1988 (in Russian).
5. Romenskaya D. V., Manin T. B., Manin B. L. Study of cytomorphological transformations of Vero-V cell monolayer depending on the time of avian metapneumovirus reproduction [Izucheniye citomorfologicheskikh transformatsiy kletochnogo monosloya Vero-V v zavisimosti ot vremeni reprodukcii metapnevмовируса ptic]. *Kletochnyye kul'tury: inform. byul.* SPb., 2012; 28: 50–55 (in Russian).
6. Stepanov A. V., Vishnyakov I. F., Strizhakov A. A. Persistence of peste de petits ruminants (PPR) virus in continuous cell lines [Persistentsiya virusa chумы melkih zhvachnyh (CHMZH) v perevivaemykh kul'turah kletok]. *Diagnostika, profilaktika i mery bor'by s osobo opasnymi, ekzoticheskimi zoo-anthropoznymi boleznyami zhivotnyh: International Scientific and Practical Conference proceedings.* Pokrov, 2000; 206–209 (in Russian).
7. Apoptosis induced by peste de petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells. B. Mondal, B. P. Sreenivasa, P. Dhar [et al.]. *Virus Res.* 2001; 73 (2): 113–119; DOI: 10.1016/S0168-1702(00)00214-8.

Поступила 11.12.18

Принята в печать 18.04.19