



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-87-94>
УДК 619:578.824.11:57.082.26



Исследование методом проточной цитометрии динамики трансформации ДНК в культуре клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции вируса бешенства

М. Н. Гусева, М. И. Доронин, М. А. Шевченко, Д. В. Михалишин, А. В. Борисов, Ю. С. Елькина, Т. В. Оковытая, В. М. Захаров, В. В. Михалишин
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьеvec, г. Владимир, 600901, Россия

РЕЗЮМЕ

Исследование посвящено изучению динамики трансформации ДНК клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции в них вируса бешенства. Инфицированные возбудителем и контрольные интактные клетки культивировались в аналогичных условиях. При выявлении зависимости инфекционности вируса от времени репродукции установили, что титр его инфекционной активности увеличивался от $(3,2 \pm 0,2)$ Ig ККИД₅₀/см³ при инокуляции до $(7,63 \pm 0,3)$ Ig ККИД₅₀/см³ через 48 ч репродукции, но более интенсивно он возрастал в первые 24 ч. Концентрация клеток при этом изменилась с 0,5 до 1,9 млн/см³, то есть выросла в 3,8 раза. Спустя 24 ч кратность прироста клеток замедлялась. В процессе изучения фаз клеточного цикла при репродукции в клетке-хозяине вируса бешенства получены результаты, позволяющие оценить продолжительность и доминирование фаз G1, S, G2 + M на разных этапах культивирования. Динамика изменений популяции клеток, находящихся в апоптозе, в контроле и опыте была одинаковой в течение 36 ч культивирования. По прошествии данного времени инфицированных клеток в стадии апоптоза было на 28–42% больше по сравнению с таковыми в контроле. Доля клеток, находящихся в стадии фазы G1, через 9 ч в опытных образцах увеличилась на 11,7%, в контрольных, наоборот, уменьшилась на 16,6%. В дальнейшем количество клеток в G1-фазе и в контроле, и в опыте изменялось одинаково: через 15–18 ч наблюдали уменьшение на 40%, далее – ростовой скачок на 45–46%, потом опять снижение на 39–40%, затем вновь увеличение. После 33 ч репродукции и до окончания культивирования доля инфицированных клеток, находящихся в фазе G1, была значительно больше (на 12–21%), чем контрольных. Количество клеток в фазе S в опыте и контроле в первые сутки репродукции вируса было одинаковым, при этом наблюдали резкое скачкообразное увеличение через 15 и 24 ч в 3,4 и 2,4 раза соответственно. Через 24 ч между инфицированными и контрольными клетками начали проявляться различия, которые постепенно возрастали с 8 до 137% к окончанию репродукции. В фазе G2 + M через 30 ч репродукции количество клеток опытных образцов начинало уменьшаться на 17–28% по сравнению с контрольными. Перестройка клетки на синтез полных частиц вируса бешенства наступала через 24 ч репродукции. Об этом говорят изменения в фазах клеточного цикла клетки-хозяина и замедление прироста самой популяции клеток линии ВНК-21/SUSP/ARRIAH.

Ключевые слова: проточная цитометрия, фазы клеточного цикла, суспензия клеток ВНК-21, вирус бешенства

Благодарности: Исследование проведено за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках научно-исследовательских работ по теме «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Гусева М. Н., Доронин М. И., Шевченко М. А., Михалишин Д. В., Борисов А. В., Елькина Ю. С., Оковытая Т. В., Захаров В. М., Михалишин В. В. Исследование методом проточной цитометрии динамики трансформации ДНК в культуре клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции вируса бешенства. *Ветеринария сегодня*. 2024; 13 (1): 87–94. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-87-94>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Гусева Марина Николаевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», мкр. Юрьеvec, г. Владимир, 600901, Россия, e-mail: guseva_mn@ariah.ru

Flow cytometry study of DNA transformation dynamics in ВНК-21/SUSP/ARRIAH cell culture during rabies virus reproduction

Marina N. Guseva, Maksim I. Doronin, Maxim A. Shevchenko, Dmitry V. Mikhailishin, Alexey V. Borisov, Yulia S. El'kina, Tatyana V. Okovytaya, Valery M. Zakharov, Valery V. Mikhailishin
Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

ABSTRACT

The study examines the DNA transformation dynamics of ВНК-21/SUSP/ARRIAH subline cells during rabies virus reproduction. Cells infected with the virus and control intact cells were cultivated under similar conditions. The identification of dependence of the virus infectivity on reproduction time revealed that the virus infectivity titre increased from (3.2 ± 0.2) Ig CCID₅₀/cm³ at the time of inoculation to (7.63 ± 0.3) Ig CCID₅₀/cm³ after 48 hours of reproduction, with the most

© Гусева М. Н., Доронин М. И., Шевченко М. А., Михалишин Д. В., Борисов А. В., Елькина Ю. С., Оковытая Т. В., Захаров В. М., Михалишин В. В., 2024
© ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2024

intensive increase having been observed within the first 24 hours. The cell concentration changed from 0.5 to 1.9 million/cm³, i.e. increased by a factor of 3.8. After 24 hours, the cell growth rate slowed down. Findings from the examination of cell cycle phases during rabies virus reproduction in the host cell allowed for the estimation of duration and predominance of G1, S, G2 + M phases at different stages of cultivation. The dynamics of changes in the apoptotic cell population in the control and test samples was similar within 36 hours of cultivation. After the said period, the proportion of apoptotic infected cells was 28–42% higher than that of apoptotic control cells. After 9 hours, the proportion of cells undergoing G1 phase increased by 11.7% in the test samples, whereas it decreased by 16.6% in the control samples. Subsequently, the number of G1 phase cells in the control and test samples changed in the same way: a 40% decrease was observed after 15–18 hours, it was followed by a 45–46% growth jump, then again a 39–40% decrease and an increase were observed. After 33 hours of reproduction and till the end of cultivation, the proportion of infected cells undergoing G1 phase was significantly higher (by 12–21%) as compared with control cells. The percentage of S phase cells in the test and control samples was the same during the first day of the virus reproduction, with sharp jump-like 3.4- and 2.4-fold increases having been observed after 15 and 24 hours, respectively. After 24 hours, the infected and control cells began to demonstrate differences, which gradually increased from 8 to 137% by the end of reproduction. After 30 hours of reproduction, the proportion of test sample cells undergoing G2 + M phase began to decrease by 17–28% as compared with the control cells. The cell switch-over to the synthesis of complete rabies virus particles occurred after 24 hours of reproduction. This is indicated by changes in the host cell cycle phases, as well as by the slowing down of BHK-21/SUSP/ARRIAH cell population growth.

Keywords: flow cytometry, cell cycle phases, BHK-21 cell suspension, rabies virus

Acknowledgements: This work was funded by the Federal Centre for Animal Health within the scope of research activities “Veterinary Welfare”.

For citation: Guseva M. N., Doronin M. I., Shevchenko M. A., Mikhailishin D. V., Borisov A. V., El'kina Yu. S., Okovyntaya T. V., Zakharov V. M., Mikhailishin V. V. Flow cytometry study of DNA transformation dynamics in BHK-21/SUSP/ARRIAH cell culture during rabies virus reproduction. *Veterinary Science Today*. 2024; 13 (1): 87–94. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-1-87-94>

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For correspondence: Marina N. Guseva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство – остро протекающая болезнь теплокровных животных, характеризующаяся поражением центральной нервной системы. К заболеванию восприимчивы домашние и дикие животные всех видов, а также человек [1, 2, 3, 4, 5].

Цикл репродукции вируса включает его адсорбцию на поверхности клеток, проникновение в клетку, раздевание, транскрипцию, трансляцию, репликацию, сборку и почкование.

Для первичной транскрипции нет необходимости в синтезе структурных белков. Для вируса бешенства присущи 2 типа транскрипции: 1) с геномной РНК сначала транскрибируется лидерная РНК, затем последовательно 5 моноцистронных мРНК, с которых в цитоплазме транслируются белки N, P, M, L, а мРНК G-гена транслируется в полисомах, связанных с мембраной комплекса Гольджи; 2) транскрипция с геномной РНК антигеномных (позитивно-полярных) РНК, которые служат матрицами для синтеза новых поколений геномных РНК отрицательной полярности. В отличие от первичной транскрипции, репликация геномной РНК по описанному механизму может происходить только одновременно с трансляцией и синтезом структурных белков, в особенности N и P, необходимых для инкапсуляции РНК в нуклеокапсидные структуры. Если белки L, N и P контролируют главным образом транскрипцию и репликацию РНК, то M-белок занимает промежуточное положение между нуклеокапсидом и оболочкой вириона, участвуя в конденсации РНК. Кроме того, M-белок играет ключевую роль в регуляции синтеза РНК и почковании вируса [6, 7]. На финальной стадии сборки и почкования нуклеокапсиды «надевают» вирусную оболочку, представленную G-белком, который

интегрирован в клеточную мембрану. Гликопротеин детерминирует нейровирулентность и нейроинвазивность вируса бешенства.

Место формирования вирусных частиц зависит от вируса и клеток хозяина. Для представителей рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*, к которому относится вирус бешенства, синтез и сборка нуклеокапсидов происходят в цитоплазме, а почкование – через плазматическую мембрану клетки, от которой вирион получает дополнительный липидный слой.

Вирус бешенства не вызывает в клетках характерные цитопатические изменения. Все события транскрипции и репликации происходят в цитоплазме внутри телец Бабеша – Негри. Данные структуры являются типичными при бешенстве и, таким образом, могут быть использованы в качестве патогномического симптома наличия инфекции [8].

Проточная цитометрия – это современная технология, обеспечивающая быстрый, качественный и мультипараметрический анализ клеток, которая получила широкое распространение в таких областях медицины, как иммунология, фармакология, цитология, онкология, гематология, генетика, инфектология [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Методом проточной цитометрии можно получить самые разные данные: определить содержание в клетке ДНК и РНК, суммарное количество белков и количество специфических белков, узнаваемых моноклональными антителами; исследовать клеточный метаболизм; изучить транспортровку ионов кальция и кинетику ферментативных реакций [15, 16, 17, 18, 19, 20].

У каждой клетки есть период существования от момента ее образования путем деления материнской клетки до митоза или гибели, получивший название

клеточного цикла. Он состоит из двух периодов: 1) период клеточного роста (интерфаза); 2) период клеточного деления – М-фаза (от греч. mitos – нить). В свою очередь, в каждом периоде выделяют несколько фаз. Обычно интерфаза занимает не меньше 90% времени всего клеточного цикла. Большая часть компонентов клетки синтезируется на протяжении всей интерфазы, это затрудняет выделение в ней отдельных стадий.

Интерфаза подразделяется на подфазы G1, S и G2. Период интерфазы, когда происходит репликация ДНК клеточного ядра, был назван «фаза S» (от греч. synthesis – синтез). Нужно отметить, что в интерфазе (в основном в фазе S) наблюдается не только репликация ДНК, но и основной биосинтез структурных и функциональных белков клетки. Период между фазой M и началом фазы S обозначен как фаза G1 (от англ. gap – промежуток), а период между концом фазы S и последующей фазой M – как фаза G2 [21].

Благодаря использованию в исследованиях проточных цитометров определены важные данные, касающиеся принадлежности клеток к фазам репродуктивного цикла, а также получены результаты, позволяющие оценить продолжительность и доминирование соответствующих фаз клеточного цикла G1, S, G2 + M на разных этапах культивирования [18, 19, 20, 22, 23]. С учетом вышеизложенного можно сделать вывод, что характер изменений клеточного цикла при репликации в клетке вируса является важным для понимания процесса его репродукции, но малоизученным фактом.

Целью работы было изучение методом проточной цитометрии динамики трансформации ДНК в культуре клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции вируса бешенства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. В работе использовали суспензионную перевиваемую культуру клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/SUSP/ARRIAH [24]. Клетки выращивали согласно «Промышленному регламенту на производство вакцины против ящура различных типов», утвержденному директором ФГБУ «ВНИИЗЖ», в культиваторах металлических с рабочим объемом до 1800 дм³.

Вирус бешенства. Для заражения клеток применяли производственный штамм «ВНИИЗЖ» вируса бешенства.

Питательная среда для выращивания клеток. Использовали среду Игла с добавлением 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота фирмы Serana (Германия) и 0,25%-го гидролизата белков крови (Россия).

Культивирование вируса бешенства. Репродукцию вируса бешенства проводили на протяжении 48 ч во флаконах объемом 0,5 дм³, используя фильтры к флакону Minisart® RC25 Syringe Filters 17764-ACK Ø 25 mm (Sartorius, Германия).

Кратность прироста высчитывали как отношение конечной (через 48 ч) и исходной концентрации клеток в пределах одного пассажа.

Заражение клеток вирусом бешенства. Культуральный вирус бешенства инокулировали в суспензионную культуру клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH в дозе 0,1 ККИД₅₀/кл. Образцы с инфицированными клетками обозначали как опытные, не зараженные вирусом клетки служили контролем и культивировали в аналогичных условиях.

Определение стадий клеточного цикла осуществляли на проточном цитометре Accuri™ C6 с помощью набора для работы с цитометром BD Cycletest™, а также набора реактивов для анализа количества ДНК в клетках C6 Flow Cytometer Fluid Kit (Becton Dickinson and Company, США).

Определение титра инфекционной активности вируса бешенства проводили согласно «Методическим рекомендациям по опосредованному определению титра инфекционной активности культурального вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ» в сырье для вакцины методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)»¹.

Пробы отбирали каждые 3 ч в течение всего времени репродукции вируса бешенства. Концентрацию клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови dA0.000.851, которая соответствует ТУ 64-1-816-84. К 1 см³ клеточной взвеси добавляли равный объем 0,2%-го раствора трипановой сини, тщательно перемешивали и заправляли камеру. Количество клеток в 1 см³ суспензии рассчитывали по формуле [21]:

$$X = \frac{A \times B \times 4000}{3600} \times 1000,$$

где X – количество клеток в 1 см³; A – общее количество клеток в камере; B – разведение суспензии.

Подсчет проводили при 10-кратном увеличении микроскопа.

Статистическая обработка данных. Цифровой материал статистически обрабатывали на персональном компьютере общепринятыми методами вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамику репродукции вируса оценивали по следующим показателям:

- зависимость титра инфекционной активности вируса от времени репродукции;
- изменения апоптоза и дебриса;
- изменения стадий клеточного цикла (G1, S, G2 + M).

При культивировании водородный показатель (pH) суспензии контролировали каждые 3 ч.

На рисунке 1 отображена динамика уровня инфекционной активности вируса бешенства при репродукции в культуре клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH.

Отмечено, что титр инфекционной активности вируса увеличивался от (3,2 ± 0,2) Ig ККИД₅₀/см³ при инокуляции до (7,63 ± 0,3) Ig ККИД₅₀/см³ через 48 ч репродукции, но более интенсивно он рос первые 24 ч (до 6,76 ККИД₅₀/см³).

Концентрация клеток за 48 ч изменилась с 0,5 до 1,9 млн/см³, то есть выросла в 3,8 раза (рис. 2).

На следующем этапе были проведены опыты по исследованию изменения титра инфекционной активности вируса бешенства в клетках ВНК-21/SUSP/ARRIAH, имеющих разную исходную концентрацию: (0,77 ± 0,1);

¹ Доронин М. И., Михалишин Д. В., Борисов А. В., Балашов А. Н., Мудрак Н. С., Захаров В. М. Методические рекомендации по опосредованному определению титра инфекционной активности культурального вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ» в сырье для вакцины методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ): утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 23.12.2021 № 66-21. Владимир; 2021. 59 с.

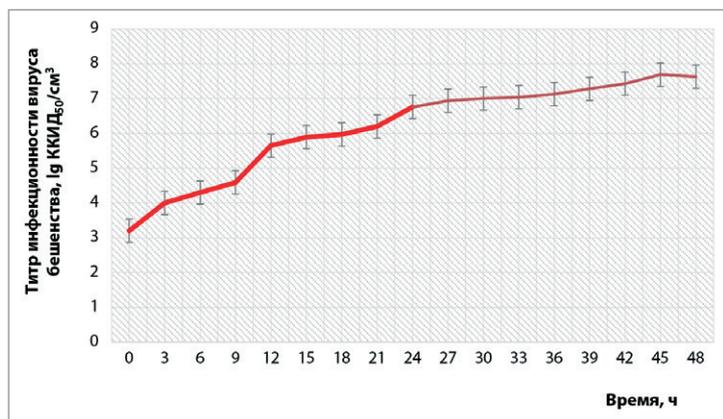


Рис. 1. Динамика уровня инфекционной активности вируса бешенства при репродукции в культуре клеток ($n = 3, p < 0,05$)

Fig. 1. Rabies virus infectivity dynamics during its reproduction in cell culture ($n = 3, p < 0.05$)

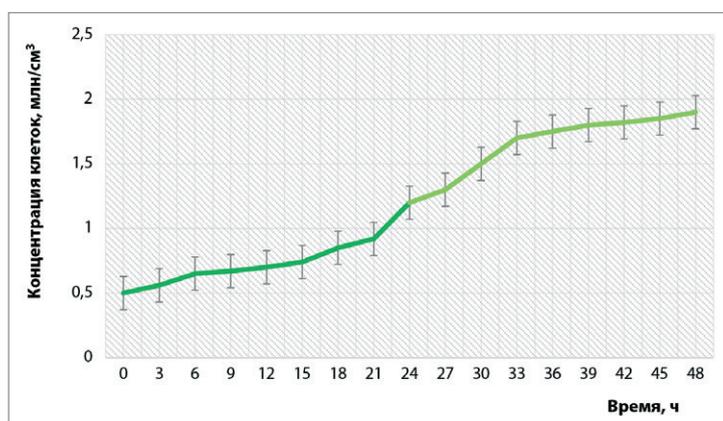


Рис. 2. Динамика изменения концентрации клеток BHK-21/SUSP/ARRIAH при репродукции вируса бешенства ($n = 3, p < 0,05$)

Fig. 2. BHK-21/SUSP/ARRIAH cell concentration dynamics during rabies virus reproduction ($n = 3, p < 0.05$)

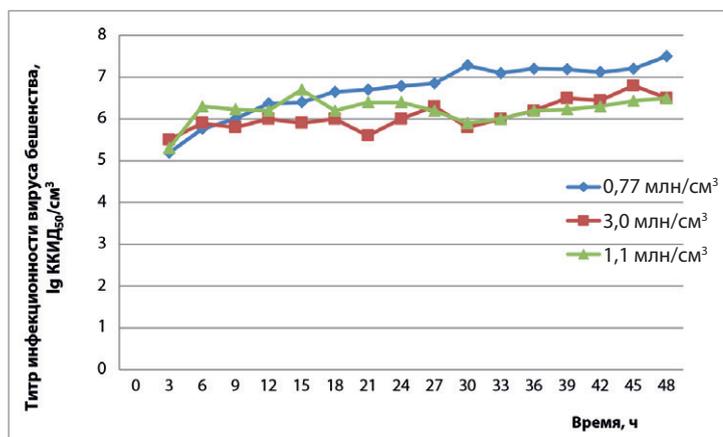


Рис. 3. Динамика накопления вируса бешенства при репродукции в клетках с различной исходной концентрацией ($n = 3, p < 0,05$)

Fig. 3. Rabies virus accumulation dynamics during its reproduction in cells with different initial concentrations ($n = 3, p < 0.05$)

($3,0 \pm 0,2$) и ($1,1 \pm 0,1$) млн/см³. Установлено, что накопление цельных вирусных частиц в зараженных клетках разных концентраций происходило в первые 12 ч репродукции (рис. 3). В дальнейшем в культуре с исходной концентрацией клеток ($0,77 \pm 0,1$) млн/см³ ви-

рус накапливался в 1,1–1,2 раза интенсивнее. Вероятно, это связано с ограниченным количеством питательных веществ для размножения и роста клеток с большей концентрацией.

Провели исследование, направленное на изучение изменений фаз клеточного цикла при культивировании вируса бешенства в клетках суспензионной линии BHK-21/SUSP/ARRIAH. В стандартных оптимальных условиях интактные популяции распределяются по фазам клеточного цикла следующим образом: G1 – 30–75%, G2 + M – 2–18%, S – 2–33%, полиплоиды – до 4% и дебрис – 1–20% [23].

Отмечено, что динамика изменений популяции клеток, находящихся в апоптозе, в контроле и опыте была аналогичной в течение 36 ч культивирования (наблюдали небольшой временной сдвиг в 3 ч между опытом и контролем через 9 и 12 ч репродукции). После 36 ч культивирования инфицированных клеток в стадии апоптоза было на 28–42% больше по сравнению с таковыми в контроле (рис. 4).

Доля клеток, находящихся в стадии фазы G1, через 9 ч в опытных образцах увеличилась на 11,7%, а в контрольных, наоборот, уменьшилась на 16,6%. В дальнейшем количество клеток в G1-фазе и в контроле, и в опыте изменялось одинаково: через 15–18 ч отмечалось уменьшение на 40%, далее – ростовой скачок на 45–46%, затем опять снижение на 39–40%, после чего вновь наблюдалось увеличение. После 33 ч репродукции и до окончания культивирования доля инфицированных клеток, находящихся в фазе G1, была значительно больше (на 12–21%), чем контрольных.

При сравнении количества клеток, находящихся в апоптозе + дебрисе и фазе G1, установили некоторую синхронность между этими фазами: через 9 ч культивирования вируса фаза G1 увеличилась на 10–12%, в то же время уменьшился на 10–11% апоптоз, после чего пошло снижение процента клеток в фазе G1 и увеличение доли клеток в апоптозе и дебрисе. Более выраженную зеркальность данных фаз клеточного цикла наблюдали после 24 ч культивирования. Аналогичная закономерность была замечена и при исследовании клеточного цикла при репродукции вируса ящера [22].

В клеточном цикле интактной популяции BHK-21/SUSP/ARRIAH также преобладала диплоидная фаза клеточного цикла (G1), во время которой начинался синтез мРНК, структурных белков, других клеточных компонентов. На эту фазу приходилось от 30 до 75% клеток в зависимости от условий культивирования, что отражено в более ранних исследованиях [23].

Известно, что в период G1-фазы клетки начинают увеличиваться в размерах, активируется мРНК и ферменты, необходимые для будущей репликации ДНК [21].

Клетки, находящиеся в фазе G1, в суспензионной культуре поддерживались на уровне 37–70% на протяжении всего времени репродукции вируса, то есть инфицированные вирусом клетки служили источником энергии и материалом для синтеза вирусных компонентов, а также для сборки цельных вирионов.

Переход от диплоидной фазы G1 в синтетическую (S-фазу) является одной из контрольных точек клеточного цикла. В зависимости от количества питательных веществ и энергии, а также от внешних факторов культивирования клетка «принимает решение» вступить в клеточный цикл или же перейти в неделящееся состояние покоя, известное как G0-фаза, которая пере-

ходит в апоптоз. Основным событием S-фазы является репликация ДНК, которая имеет свои особенности [21].

В наших исследованиях процент клеток в S-фазе в опыте и контроле в первые сутки репродукции вируса был одинаковым, при этом наблюдали резкое его увеличение в виде скачков через 15 и 24 ч в 3,4 и 2,4 раза соответственно (рис. 5). Через 24 ч между инфицированными и контрольными клетками начали проявляться различия, которые постепенно возрастали с 8 до 137% к окончанию репродукции. Можно предположить, что клетки, находящиеся в этой фазе, также участвовали в репродукции вируса.

В фазе G2 – последней из трех последовательных фаз интерфазной стадии клеточного цикла – и M-фазе образовывалась тетраплоидная популяция. В интактных и инфицированных вирусом бешенства клетках линии ВНК-21/SUSP/ARRIAH на фазу подготовки к митозу и сам митоз приходилось от 2 до 20% всей популяции. Через 30 ч репродукции количество клеток опытных образцов в данных фазах начинало уменьшаться на 17–28% по сравнению с контрольными (рис. 6). Вероятно, это было связано с тем, что ингибировались общий биосинтез и функции клетки-хозяина в результате биосинтеза компонентов вируса бешенства, поэтому уменьшался процент клеток, находящихся в фазе G2 + M.

Количество полиплоидных клеток в опыте было примерно равным на протяжении 45 ч, только в последние часы репродукции вируса наблюдали их резкий скачок в 2,0–2,5 раза, в то время как в контрольных клетках плоидность популяции имела скачкообразный характер: увеличение через 9, 21, 42 и 48 ч в 2,06; 2,7; 1,56 и 3,18 раза соответственно. Можно предположить, что имелась частичная резистентность полиплоидных клеток к вирусу. Данный факт уже был отмечен раньше при исследовании репродукции ящура в клетках ВНК-21 [22].

ДНК-гистограммы клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции в них вируса бешенства через 24 ч после начала заражения и через 42 ч культивирования (рис. 7) обобщают графики, представленные на рисунках 4–6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы фазы клеточного цикла при репродукции в клетке-хозяине вируса бешенства, получены результаты, позволяющие оценить продолжительность и доминирование соответствующих фаз клеточного цикла G1, S, G2 + M на разных этапах культивирования.

При изучении динамики изменений, происходящих в ДНК инфицированных вирусом бешенства клеток линии ВНК-21/SUSP/ARRIAH, замечено, что через 24 ч культивирования вируса росло количество клеток в фазе G1 по сравнению с контролем (на 12–21%). Так как в фазе G1 идет синтез мРНК, структурных белков, других клеточных компонентов, которые необходимы для сборки вирионов возбудителя бешенства, то рост клеток в данной фазе цикла можно считать закономерным.

Обнаружено, что поскольку главным событием фазы S является репликация ДНК, то линейное уменьшение фазы S при культивировании вируса бешенства после 24 ч репродукции также может указывать на перестройку клетки на синтез вирусной РНК, а не репликацию клеточной ДНК.

Выявлено, что фаза G2 и фаза M (постсинтетическая, или премитотическая, и сам митоз) жизненного цикла

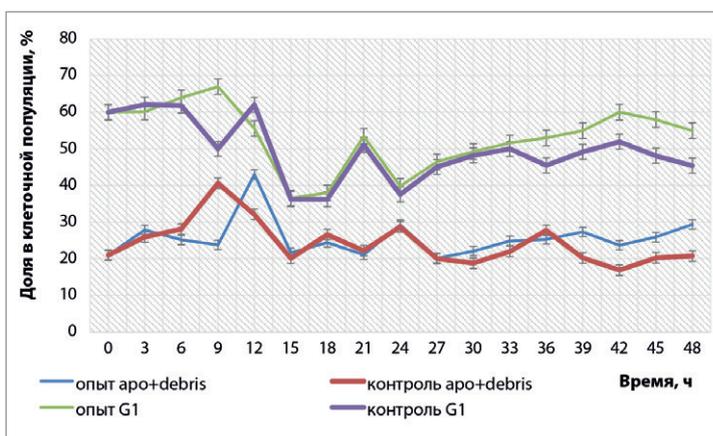


Рис. 4. Изменение процентного соотношения клеток, находящихся на стадиях апоптоза + дебриса и фазы G1, в культуре ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции вируса бешенства ($n = 3, p < 0,05$)

Fig. 4. Changes in percentages of cells undergoing apoptosis + debris and G1 phase in BHK-21/SUSP/ARRIAH culture during rabies virus reproduction ($n = 3, p < 0.05$)

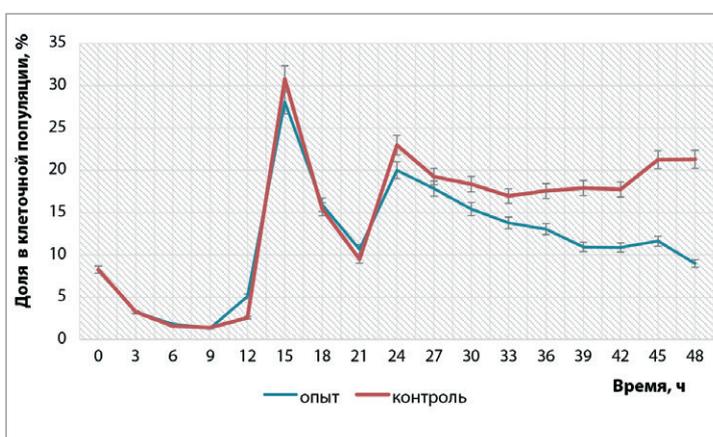


Рис. 5. Изменение процентного соотношения клеток, находящихся на стадии S-фазы, в культуре ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции вируса бешенства ($n = 3, p < 0,05$)

Fig. 5. Changes in percentages of cells undergoing S phase in BHK-21/SUSP/ARRIAH culture during rabies virus reproduction ($n = 3, p < 0.05$)

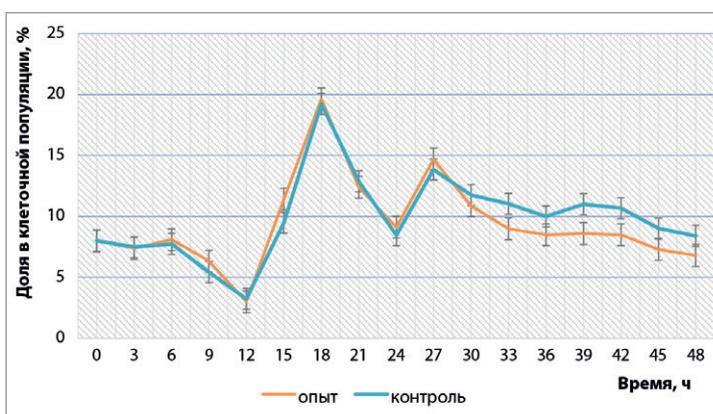


Рис. 6. Изменение процентного соотношения клеток, находящихся на стадии G2 + M, в культуре ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции вируса бешенства ($n = 3, p < 0,05$)

Fig. 6. Changes in percentages of G2 + M phase cells in BHK-21/SUSP/ARRIAH culture during rabies virus reproduction ($n = 3, p < 0.05$)

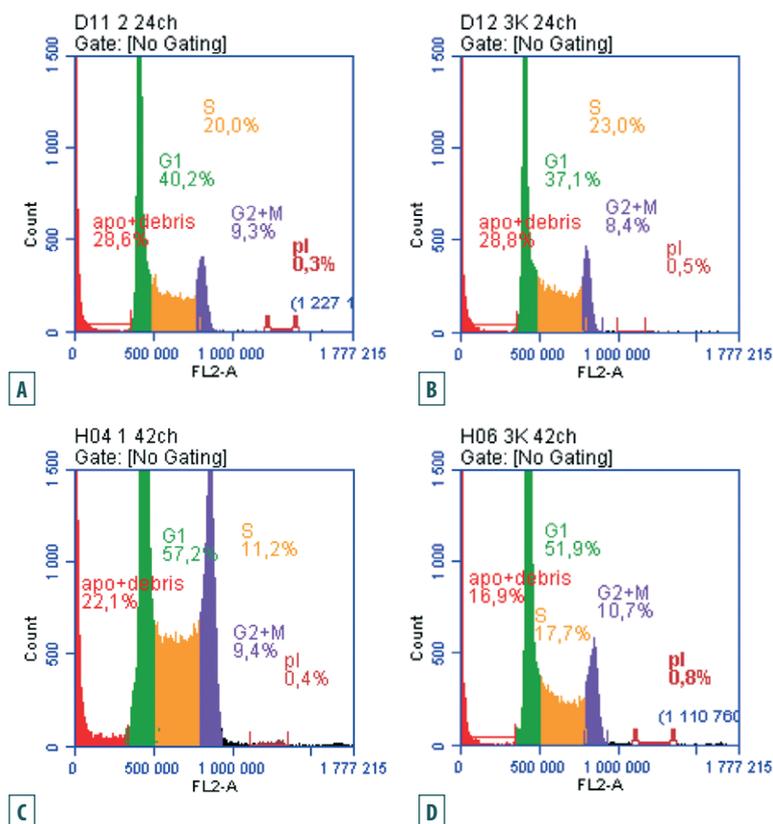


Рис. 7. Сравнение ДНК-гистограмм клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH при репродукции в них вируса бешенства и контрольных образцов через 24 ч (А – опыт, В – контроль) и через 42 ч (С – опыт, D – контроль)

Fig. 7. Comparison of DNA histograms of BHK-21/SUSP/ARRIAH cells during rabies virus reproduction and those of control samples after 24 hours (A – test, B – control) and after 42 hours (C – test, D – control)

клеток опытных образцов относительно уменьшались (на 17–28%) по отношению к контрольным, то есть инфицированные клетки находились в стадии деления меньше, чем неинфицированные. Вероятно, это было связано с тем, что ингибировались общий биосинтез и функции клетки-хозяина в результате биосинтеза компонентов вируса бешенства.

Определено, что полиплоидные клетки, которые образовывались в процессе культивирования клеток и вируса, были частично резистентны к возбудителю бешенства и, вероятно, обладали наименьшей чувствительностью.

Установлено, что перестройка клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH на синтез полных частиц вируса бешенства наступала через 24 ч репродукции, о чем свидетельствуют изменения в фазах клеточного цикла клетки-хозяина, замедление прироста самой популяции клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП; 2001. 928 с.
- Груздев К. Н., Метлин А. Е. Бешенство животных. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019. 394 с. EDN: FCSNON
- Макаров В. В., Гулюкин А. М., Гулюкин М. И. Бешенство: естественная история на рубеже столетий. М.: ЗооВетКнига; 2015. 121 с. EDN: TXECSR
- Макаров В. В., Лозовой Д. А., Брико Н. И. Бешенство рукокрылых и человек. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 6: 46–53. EDN: VEAETL
- Метлин А. Е. Современные аспекты классификации лиссавирусов. *Ветеринария сегодня*. 2017; (3): 52–57. EDN: ZIGAFP

6. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред. Д. К. Львова. М.: Медицинское информационное агентство; 2013; 1200 с.

7. Bourhy H., Cowley J. A., Larroux F., Holmes E. C., Walker P. J. Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. *Journal of General Virology*. 2005; 86 (10): 2849–2858. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81128-0>

8. Albertini A. A. V., Schoehn G., Weissenhorn W., Ruigrok R. W. H. Structural aspects of rabies virus replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65 (2): 282–294. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7298-1>

9. Барабаш Е. Ю., Калинина Е. П., Гвозденко Т. А., Денисенко Ю. К., Новгородцева Т. П., Антонюк М. В., Ходосова К. К. Регуляция иммунного ответа у пациентов с частично контролируемой и контролируемой бронхиальной астмой. *Медицинская иммунология*. 2017; 19 (1): 65–72. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-65-72>

10. Войткова В. В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы). *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2010; 6-1 (76): 220–225. EDN: OHWEVV

11. Ищенко И. О., Опедизано М. Д. Л. Совершенствование оценки противоопухолевого иммунитета с использованием метода проточной цитометрии. *Forcipe*. 2019; 2 (4): 24–31. EDN: STCTRI

12. Козырева В. С., Шилова А. Н., Шкода О. С. Использование метода проточной цитометрии для контроля содержания остаточных лейкоцитов в плазме крови. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64 (1): 66–72. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-66-72>

13. Ягунов А. С., Карташев А. В., Токалов С. В., Киселева Л. Н. Основные этапы разработки и применения метода проточной цитометрии в ФГУ РНЦРХТ. *Вопросы онкологии*. 2008; 54 (4): 494–497. EDN: JVSUZB

14. Стахнёва Е. М., Рагино Ю. И. Современные методы исследования атеросклероза и ишемической болезни сердца: проточная цитометрия. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021; 20 (2): 184–190. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-2-184-190>

15. Barnum K. J., O'Connell M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. *In: Cell Cycle Control. Methods in Molecular Biology*. Eds. E. Noguchi, M. Gadaleta. 2014; 1170: 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2

16. Манин Б. Л., Ночевный В. Т., Хайдуков С. В., Ласкавый В. Н. Эффективность метода проточной цитометрии в изучении механизмов репарации клеток ВНК-21 в процессе культивирования и криоконсервирования. *Ветеринарна медицина*. 2011; 95: 66–70. EDN: SMUJVJ

17. Sherman J., Wang R. Rapid profiling of G2 phase to mitosis progression by flow cytometry in asynchronous cells. *Cell Cycle*. 2020; 19 (21): 2897–2905. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1827510>

18. Rieger A. M. Flow cytometry and cell cycle analysis: An overview. In: *Cell-Cycle Synchronization. Methods in Molecular Biology*. Ed. Z. Wang. 2022; 2579: 47–57. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_4

19. Kim K. H., Sederstrom J. M. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2015; 111: 28.6.1–28.6.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2806s11>

20. Nair A., Manohar S. M. A flow cytometric journey into cell cycle analysis. *Bioanalysis*. 2021; 13 (21): 1627–1644. <https://doi.org/10.4155/bio-2021-0071>

21. Клетки. Под ред. Б. Льюина, Л. Кассимериса, В. П. Лингаппы, Д. Плоппера. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2011. 951 с.

22. Гусева М. Н., Шевченко М. А., Михалишин Д. В., Михалишин В. В., Манин Б. Л. Изучение методом проточной цитометрии динамики трансформации ДНК в культуре клеток ВНК-21/2-17 при репродукции вируса ящура. *Ветеринария сегодня*. 2018; (4): 39–43. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-39-43>

23. Шевченко М. А., Гусева М. Н., Михалишин Д. В., Манин Б. Л., Шишкова А. А. Исследование клеточного цикла линии ВНК-21/2-17 методом проточной цитометрии. *Ветеринария сегодня*. 2017; (4): 58–62. EDN: YKWAND

24. Лозовой Д. А., Гусева М. Н., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Манин Б. Л., Шишкова А. А. и др. ВНК-21/SUSP/ARRIAH – перевиваемая суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3, болезни Ауески при производстве противовирусных вакцин, а также для изготовления диагностических и профилактических ветеринарных биопрепаратов. Патент № 2722671 С1 Российская Федерация, МПК C12N 5/10 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2019131190. Заявл. 01.10.2019. Опубл. 02.06.2020. Бюл. № 16.

REFERENCES

1. Syurin V. N., Samuilenko A. Ya., Solov'yev B. V., Fomina N. V. *Viral Diseases of Animals*. Moscow: VNIITIBP; 2001. 928 p. (in Russ.)

2. Gruzdev K. N., Metlin A. E. *Animal Rabies*. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2019. 394 p. EDN: FCSNOH (in Russ.)

3. Makarov V. V., Gulyukin A. M., Gulyukin M. I. *Rabies: Natural History at Centuries Boundary*. Moscow: ZooVetKniga; 2015. 121 p. EDN: TXECJR (in Russ.)

4. Makarov V. V., Lozovoy D. A., Briko N. I. Cheiropter rabies and man. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2015; 6: 46–53. EDN: VEAETL (in Russ.)

5. Metlin A. Ye. Modern aspects of lyssavirus classification. *Veterinary Science Today*. 2017; (3): 52–57. EDN: ZIGAFP (in Russ.)

6. *Guidance on Virology. Human and Animal Viruses and Viral Infections*. Ed. by D. K. Lvov. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2013. 1200 p. (in Russ.)

7. Bourhy H., Cowley J. A., Larrous F., Holmes E. C., Walker P. J. Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. *Journal of General Virology*. 2005; 86 (10): 2849–2858. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81128-0>

8. Albertini A. A. V., Schoehn G., Weissenhorn W., Ruigrok R. W. H. Structural aspects of rabies virus replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65 (2): 282–294. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7298-1>

9. Barabash E. Yu., Kalinina E. P., Gvozdenko T. A., Denisenko Yu. K., Novgorodtseva T. P., Antonyuk M. V., Khodosova K. K. Regulation of im-

mune response of patients with partially controlled vs controlled bronchial asthma. *Medical Immunology (Russia)*. 2017; 19 (1): 65–72. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-65-72> (in Russ.)

10. Voitkova V. V. Study of apoptosis with use of flow cytometry (review of literature). *Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center*. 2010; 6-1 (76): 220–225. EDN: OHWEVV (in Russ.)

11. Ishchenko I. O., Oppedisano M. D. L. Improvement of antitumoral immunity assessment using the method of flow cytometry. *Forcipe*. 2019; 2 (4): 24–31. EDN: STCTRI (in Russ.)

12. Kozyreva V. S., Shilova A. N., Shkoda O. S. Flow cytometry for measuring residual leukocytes in blood plasma. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2019; 64 (1): 66–72. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-66-72> (in Russ.)

13. Yagunov A. S., Kartashov A. V., Tokalov S. V., Kiseleva L. N. Main milestones of development and application of ductal cytometry at the Russian center for research in radiological and surgical techniques, St. Petersburg. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2008; 54 (4): 494–497. EDN: JVSUZB (in Russ.)

14. Stakhneva E. M., Ragino Yu. I. Modern methods for studying atherosclerosis and coronary artery disease: flow cytometry. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20 (2): 184–190. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-2-184-190>

15. Barnum K. J., O'Connell M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. In: *Cell Cycle Control. Methods in Molecular Biology*. Eds. E. Noguchi, M. Gadaleta. 2014; 1170: 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2

16. Manin B. L., Nochevny V. T., Khaidukov S. V., Laskavy V. N. Efficiency of flow cytometric analysis used to study of mechanisms of reparation of BHK-21 cells in the process of cultivation and cryoconservation. *Veterinary Medicine*. 2011; 95: 66–70. EDN: SMUJVJ (in Russ.)

17. Sherman J., Wang R. Rapid profiling of G2 phase to mitosis progression by flow cytometry in asynchronous cells. *Cell Cycle*. 2020; 19 (21): 2897–2905. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1827510>

18. Rieger A. M. Flow cytometry and cell cycle analysis: An overview. In: *Cell-Cycle Synchronization. Methods in Molecular Biology*. Ed. Z. Wang. 2022; 2579: 47–57. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_4

19. Kim K. H., Sederstrom J. M. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2015; 111: 28.6.1–28.6.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2806s11>

20. Nair A., Manohar S. M. A flow cytometric journey into cell cycle analysis. *Bioanalysis*. 2021; 13 (21): 1627–1644. <https://doi.org/10.4155/bio-2021-0071>

21. Cells. Eds. B. Lewin, L. Cassimeris, V. R. Lingappa, G. Plopper. Sudbury (Massachusetts): Jones and Bartlett Publishers; 2007. 863 p.

22. Guseva M. N., Shevchenko M. A., Mikhailishin D. V., Mikhailishin V. V., Manin B. L. Study of DNA transformation dynamics in BHK-21/2-17 cell culture using flow cytometry during FMD virus reproduction. *Veterinary Science Today*. 2018; (4): 39–43. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-39-43>

23. Shevchenko M. A., Guseva M. N., Mikhailishin D. V., Manin B. L., Shishkova A. A. Studies of the BHK-21/2-17 lineage using flow cytometry. *Veterinary Science Today*. 2017; (4): 58–62. EDN: YKWAND (in Russ.)

24. Lozovoj D. A., Guseva M. N., Mikhailishin D. V., Doronin M. I., Manin B. L., Shishkova A. A., et al. BHK-21/SUSP/ARRIAH – continuous suspension subline of newborn Syrian hamster kidney cells, intended for reproduction of foot-and-mouth disease viruses, rabies, parainfluenza-3, Aujeszky's disease in producing antiviral vaccines, as well as for making diagnostic and preventive veterinary biopreparations. Patent No. 2722671 C1 Russian Federation. Int. Cl. C12N 5/10 (2006.01). FGBI "ARRIAH". No. 2019131190. Date of filing: 01.10.2019. Date of publication: 02.06.2020. Bull. No. 16.

Поступила в редакцию / Received 22.08.2023

Поступила после рецензирования / Revised 09.10.2023

Принята к публикации / Accepted 08.11.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гусева Марина Николаевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3997-3390>, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

Доронин Максим Игоревич, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru

Marina N. Guseva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3997-3390>, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

Maksim I. Doronin, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru

Шевченко Максим Александрович, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0006-5874-8363>, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

Михалишин Дмитрий Валерьевич, д-р вет. наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

Борисов Алексей Валерьевич, канд. вет. наук, начальник отдела лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9880-9657>, e-mail: borisov_av@arriah.ru

Елькина Юлия Сергеевна, канд. вет. наук, младший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2986-8992>, e-mail: elkina_ys@arriah.ru

Оковитая Татьяна Владимировна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0002-8403-8665>, e-mail: okovitaya@arriah.ru

Захаров Валерий Михайлович, д-р вет. наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; Author ID: 7402991265, e-mail: zaharov@arriah.ru

Михалишин Валерий Васильевич, д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0001-9538-5657>, e-mail: mihalishin@arriah.ru

Maxim A. Shevchenko, Leading Veterinarian, Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0006-5874-8363>, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

Dmitry V. Mikhailishin, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

Alexey V. Borisov, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Department, Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9880-9657>, e-mail: borisov_av@arriah.ru

Yulia S. El'kina, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2986-8992>, e-mail: elkina_ys@arriah.ru

Tatyana V. Okovytaya, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0002-8403-8665>, e-mail: okovitaya@arriah.ru

Valery M. Zakharov, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; Author ID: 7402991265, e-mail: zaharov@arriah.ru

Valery V. Mikhailishin, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0001-9538-5657>, e-mail: mihalishin@arriah.ru

Вклад авторов: Гусева М. Н. – концепция исследования, интерпретация данных, подготовка текста, работа с литературой, анализ и обобщение результатов исследования; Доронин М. И. – концепция исследования, биоинформатический анализ, проведение статистического анализа; Шевченко М. А. – проведение экспериментов, сбор материала; Михалишин Д. В. – концепция исследования, администрирование, получение финансирования, ресурсное обеспечение исследования; Борисов А. В. – интерпретация данных, подготовка текста, работа с литературой; Елькина Ю. С. – проведение экспериментов, сбор материала; Оковитая Т. В. – проведение экспериментов, сбор материала; Захаров В. М. – администрирование, редактирование текста; Михалишин В. В. – концепция исследования, анализ и обобщение результатов исследования, утверждение окончательного варианта.

Contribution: Guseva M. N. – conceptualization, data interpretation, text preparation, literature searches, analysis and synthesis of study findings; Doronin M. I. – conceptualization, bioinformatic analysis, statistical analysis; Shevchenko M. A. – experimentation, data collection; Mikhailishin D. V. – conceptualization, administration, funding acquisition, resource provision; Borisov A. V. – data interpretation, text preparation, literature searches; El'kina Yu. S. – experimentation, data collection; Okovytaya T. V. – experimentation, data collection; Zakharov V. M. – administration, text editing; Mikhailishin V. V. – conceptualization, analysis and synthesis of study findings, final version approval.