

**Л.Ю. Нестерова**

асистент

Національний аграрний університет, м. Луганськ

## **ВПЛИВ ЕПІЗООТИЧНИХ ШТАМІВ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ НА МІТОТИЧНИЙ РЕЖИМ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН VERO**

*Виявлено пригнічення мітотичної активності перещеплюваної культури клітин VERO, інфікованої епізоотичними штамами вірусу інфекційного бронхіту курей, зі збільшенням кількості атипових форм мітозів, серед яких переважають триполюсна метафаза, формування мікроядер та хромосомні мости.*

### **Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень**

Останнім часом все більш актуальними стають захворювання тварин, птиці та людей, що викликані коронавірусами, у тому числі й атипова

---

Науковий керівник – к.вет.н., доц. Л.І. Пархоменко

© Л.Ю. Нестерова

пневмонія (SARS) [1]. Вірус інфекційного бронхіту курей (ІБК) є типовим представником родини Coronaviridae та залишається однією з основних причин значних економічних збитків у країнах з розвинутим птахівництвом в усьому світі [2].

На сьогодні виділено та ідентифіковано понад 20-ти серотипів збудника інфекційного бронхіту, кількість яких збільшується. Популяція вірусу ІБК у кожній країні постійно змінюється. Це, в першу чергу, пов'язано з високою генетичною та еволюційною мінливістю збудника, що призводить до появи нових антигенних варіантів, які значно відрізняються за антигенними та біологічними властивостями від раніш відомих штамів вірусу інфекційного бронхіту курей (ВІБ).

У зв'язку з викладеним вище, виділення циркулюючих на території України епізоотичних штамів вірусу ІБК та вивчення їх властивостей з подальшим використанням як вакцинних є пріоритетним напрямком наукових досліджень.

#### **Мета та завдання**

Визначити мітотичний режим перещеплюваної культури клітин VERO, інфікованою епізоотичними штамми ВІБ. Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

1. Провести культивування епізоотичних штамів ВІБ у перещеплюваній культурі клітин VERO.
2. Встановити мітотичний індекс, фази мітозу та кількість патологічних мітозів серед клітин, що діляться в інфікованій культурі клітин VERO.

#### **Матеріали і методи досліджень**

В дослідженнях використовували епізоотичні штами ЛІ-1 та ЛІ-2 вірусу ІБК, виділені від хворої на ІБК птиці 240-добового віку та від птиці 150-добового віку з наявністю патолого-анатомічних змін (збільшення нирок та селезінки, гіперемія легень, оваріосальпінгіт, жовтковий перитоніт) відповідно.

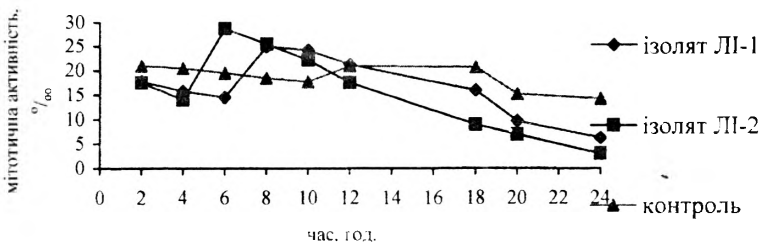
Для інфікування епізоотичними штамми використовували культуру клітин зі 100 % моношаром. Вірусний матеріал вносили в об'ємі 0,2 мл. Час контакту вірусу з клітинами становив 60 хвилин. Для одержання вірусу інфіковані клітини підлягали триразовому послідовному заморожуванню-відтаюванню.

Для цитологічного контролю росту клітини VERO вирощували на покривних скельцях, що вносили до флаконів, при цьому посівну концентрацію клітин збільшували удвічі. Для фарбування застосовували гематоксилін Карачі й еозин, попередньо фіксуючи препарати сумішшю льодяної оцтової кислоти та абсолютного спирту у співвідношенні 1:3 [3].

Мітотичний режим культури VERO після проведення 3-х пасажів епізоотичних штамів ЛІ-1 та ЛІ-2 ВІБ визначали за мітотичним індексом, фазами мітозу та кількістю патологічних мітозів. Мітотичну активність клітин визначали через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 20 та 24 годин після зараження ізолятами. Для цього покривні скельця виймали з флаконів, клітини фіксували сумішшю спирту й оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 та фарбували гематоксиліном Карачі. За контроль використовували інтактні культури клітин. За мітотичний індекс, який виражали в проміле (‰), приймали кількість клітин, що діляться мітозом на 1000 підрахованих. Патологічні форми мітозів у інфікованій культурі клітин VERO визначали за класифікацією Блюмкіна та Жданова у відсотках до відповідного мітотичного індексу [4].

### Результати досліджень

За даними вчених, максимум мітотичної активності, незалежно від виду клітинної культури, встановлено на 3–4-ту добу [5, 6]. Мітотична активність інтактної культури VERO досягає максимуму (24 ‰) на 2-гу добу після пересіву. Різні штами вірусів стимулюють, пригнічують або зовсім не впливають на мітотичну активність клітин. Мітотична активність культури VERO через 2 години після внесення вірусу дорівнювала 17,75 ‰ (ізолят ЛІ-1) та 17,5 ‰ (ізолят ЛІ-2), тоді як у контрольних культурах – 21,0 ‰ (рис. 1).



*Рис. 1. Мітотична активність культури VERO, інфікованої польовими ізолятами вірусу ІБК*

Через 4 години після інфікування мітотична активність у культурах, заражених обома ізолятами вірусу ІБК, поступово знижувалася. Проте, починаючи з 6 годин, встановлено збільшення кількості мітозів в інфікованих ізолятом ЛІ-2 культурах: мітотична активність досягла 28,75 ‰ в той час, коли в контрольній культурі вона дорівнювала 19,5 ‰. Збільшення даного показника після інфікування культури клітин ізолятом ЛІ-1 було зареєстровано через 8 годин. Починаючи з 8 та 10 години після

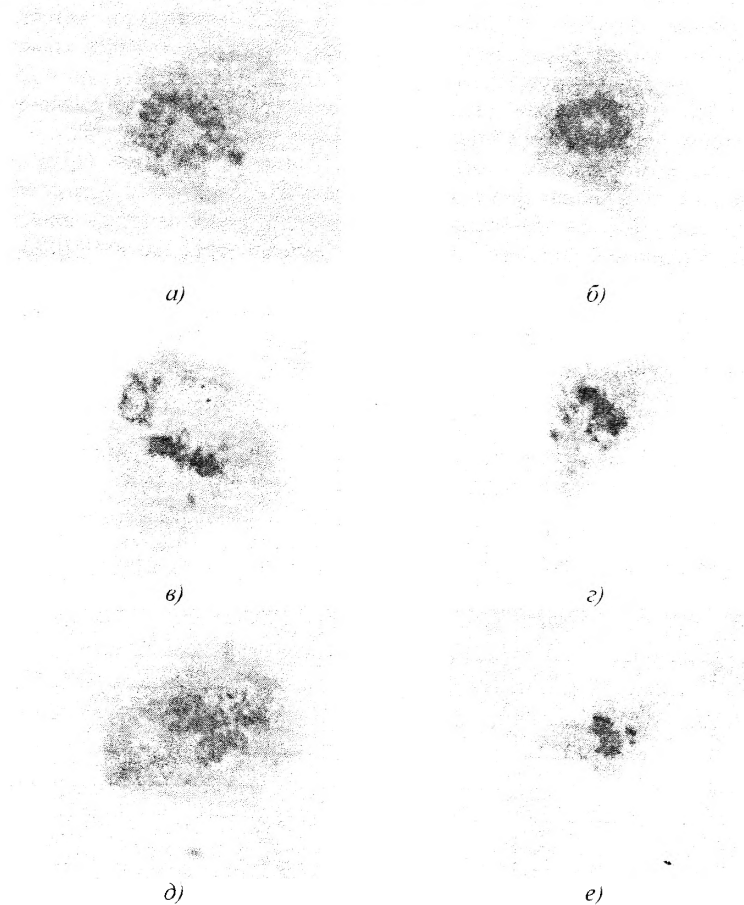
інфікування культури ізолятами ЛІ-1 та ЛІ-2 відповідно, мітотична активність клітин поступово знижувалася. Через 24 години кількість мітозів у заражених культурах становила від 3,0 (ізолят ЛІ-2) до 6,25 % (ізолят ЛІ-1). Мітотична активність контрольних культур після незначного збільшення через 12 годин набувала незначних змін.

Подальшим якісним аналізом мітотичного режиму (мітотична активність, відношення фаз мітозу, кількість атипових форм мітозу серед клітин, що діляться, переважні форми патологічних мітозів) виявлено значне збільшення кількості патологічних мітозів серед клітин VERO, що інфіковані польовими ізолятами вірусу ІБК. Максимальна кількість патологічних мітозів була зареєстрована через 10 годин після інфікування КК ізолятом ЛІ-1 (47,5 %) та через 8 годин після інфікування ізолятом ЛІ-2 (51,25 %) (табл.). Для клітин VERO кількість патологічних мітозів сягає від 0 до 15 %.

*Таблиця. Кількість патологічних мітозів серед клітин, що діляться, інфікованих польовими ізолятами вірусу ІБК*

Термін досліджу, год.	Кількість патологічних мітозів, %		
	інфікована культура		контрольна культура
	ізолят ЛІ-1	ізолят ЛІ-2	
2	11,25	18,75	6,25
4	15,75	33,0	6,0
6	25,25	49,0	5,75
8	46,0	51,25	4,5
10	47,5	38,75	4,25
12	39,0	32,75	7,75
18	29,0	23,5	7,0
20	18,25	17,0	5,25
24	13,0	12,75	5,0

При вивченні атипових форм мітозу в інфікованій польовими ізолятами ЛІ-1 та ЛІ-2 культурі клітин VERO було визначено, що їх переважною формою є патологічна метафаза, а саме: відставання поодиноких хромосом або фрагментів хромосом, розсіювання незмінних хромосом, а також пола метафаза. Крім того, в культурі, інфікованій ізолятом ЛІ-1 ВІВ, спостерігали триполюсну метафазу, формування мікроядер, тоді як ізолят ЛІ-2 індукував утворення хромосомних мостів (рис. 1). За даними І.А. Алова [7], така форма патології мітозу зустрічається при різних патологічних процесах у клітинах.



*Рис. 1. Патологічні мітози в клітинах VERO,  
інфікованих польовими ізолятами ЛІ-1 та ЛІ-2 вірусу ІБК:*

*а, б – пола метафаза;*

*в, г – відставання хромосом у метакінезі (збільш. ок.  $\times 10$ , об.  $\times 90$ );*

*д – триполюсна метафаза;*

*е – формування мікроядер (збільш. ок.  $\times 10$ , об.  $\times 90$ ).*

*Гематоксилін-еозин*

### Висновки

1. Виявлено пригнічення мітотичної активності перешеплюваної культури клітин VERO, інфікованої ізолятами ВІВ, зі збільшенням кількості атипових форм мітозів.

2. Пригнічення процесу поділу клітин епізоотичними штамами ЛІ-1 до 6,25 % та ЛІ-2 до 3 % через 24 години встановлено після короткочасної стимуляції мітотичної активності культури VERO після інфікування через 8 та 6 годин відповідно.

3. Серед атипових форм мітозів, індукованих епізоотичним штамом ЛІ-1, переважають триполюсна метафаза і формування мікроядер, тоді як при використанні штаму ЛІ-2 – хромосомні мости.

### Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження слід зосередити на визначенні регламенту культивування епізоотичних штамів ЛІ-1 та ЛІ-2 ВІВ у перешеплюваній культурі клітин VERO.

### Література

---

1. *Bijlenga G.* Proposal for vaccination against SARS coronavirus using avian infectious bronchitis virus strain H from the Netherlands // *J Infect.* – 2005. – Vol. 51. – № 3. – Pp. 263–265.
  2. *Cavanagh D.* Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus // *Avian Pathol.* – 2003. – Vol. 32. – № 6. – Pp. 567–582.
  3. Методические рекомендации по консервированию клеточных культур и тканей в условиях низкотемпературных банков / В.С. Белоконов, П.Т. Берус, Б.Т. Стегний, Р.И. Кульбит // Протокол № 26 от 7 декабря 1990 г. – г. Харьков. – 19 с.
  4. *Блюмкин В.Н., Жданов В.М.* Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. – М.: Медицина, 1973.
  5. *Монастырева Л.А.* Митотический режим культур перевиваемой линии RES (клон I), инфицированных арбовирусом Сан-Луи // *Вопр. вирусол.* – 1969. – № 1. – С. 28–31.
  6. *Зарипова Ф.Г., Гулевич Н.Е.* Изучение некоторых свойств перевиваемой линии клеток RH // *Цитология.* – 1973. – № 15. – С. 746–750.
  7. *Алов И.А., Брауде А.И., Аспиз М.Е.* Основы функциональной морфологии клетки / Под общ. ред. проф. И.А. Алова. – М.: Медицина, 1969. – 342 с.
-