

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДИНАМИКИ ТРАНСФОРМАЦИИ ДНК В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21/2-17 ПРИ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ЯЩУРА

М. Н. Гусева¹, М. А. Шевченко², Д. В. Михалишин³, В. В. Михалишин⁴, Б. Л. Манин⁵

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

² Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

³ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: mihalishin_dv@arriah.ru

⁴ Главный эксперт, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: mihalishin@arriah.ru

⁵ Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: manin_bl@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В задачу исследований входило изучение динамики трансформации ДНК клеток ВНК-21/2-17 при репродукции в них вируса ящура. Отмечено, что разрушение основной популяции клеток совпадало по времени с увеличением апоптотических клеток и количеством детрита. Через 3 ч после инфицирования культуры клеток наблюдалось увеличение апоптоза и детрита, уменьшение на 17–21% G₁-фазы, увеличение в 2,3 раза многоядерных клеток. Через 7 ч резко увеличивалась гибель клеток. Выявлено, что на всех этапах культивирования вируса ящура в суспензионной линии клеток ВНК-21/2-17 преобладала диплоидная форма клеток – G₁(2n), которая являлась основой при репродукции вируса. Клетки, находившиеся в синтетической (S), G₂- и M-фазах, были менее подвержены действию вируса. Проточная цитометрия позволила определить количественные параметры фаз клеточного цикла при репродукции в клетках вируса ящура. Также удалось провести сравнение между этими фазами, жизнеспособностью культуры клеток и динамикой репродукции вируса. Проведенные исследования цитопатического действия вируса ящура в клетках ВНК-21/2-17 показали, что одним из направлений оптимизации производства культуральных вакцин может быть применение фактора торможения пролиферации на определенной фазе клеточного цикла.

Ключевые слова: проточная цитометрия, фазы клеточного цикла, суспензия клеток ВНК-21/2-17, вирус ящура.

STUDY OF DNA TRANSFORMATION DYNAMICS IN BHK-21/2-17 CELL CULTURE USING FLOW CYTOMETRY DURING FMDV VIRUS REPRODUCTION

M. N. Guseva¹, M. A. Shevchenko², D. V. Mikhailishin³, V. V. Mikhailishin⁴, B. L. Manin⁵

¹ Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

² Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: mihalishin_dv@arriah.ru

⁴ Chief Expert, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: mihalishin@arriah.ru

⁵ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: manin_bl@arriah.ru

SUMMARY

The research tasks covered the study of BHK-21/2-17 cell DNA transformation dynamics during FMDV reproduction process. It was noted that the destruction of major cell population coincided with the increase in apoptotic cell number and detritus amount. Three hours post cell culture infection increase in apoptosis and detritus was observed, G₁-phase decreased by 17–21% and polynuclear cells grew by 2.3 times. In seven hours, the drastic rise in cell death was noted. It was established that at all stages of FMDV culture in BHK-21/2-17 suspension cell line, diploid cells G₁(2n) were predominant, being basic cells for the virus reproduction. Cells in synthetic (S) and G₂- and M-phases were less susceptible to virus. Using flow cytometry technique made it possible to quantify cell cycle phases during reproduction in FMDV cells. We also succeeded in comparing between these phases, virus livability and virus reproduction dynamics. The study of FMDV cytopathic effect in BHK-21/2-17 cells demonstrated that one of the optimization trends in culture vaccine production include proliferation inhibitory factor use at a certain cell cycle phase.

Key words: flow cytometry, cell cycle phases, BHK-21/2-17 cell suspension, foot-and-mouth disease virus.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – остро протекающее высококонтагиозное заболевание парнокопытных животных. Механизм размножения данного афтовируса носит цитотоксичный характер, сопровождаясь гибелью инфицированных клеток. Цикл репродукции вируса состоит из следующих основных стадий: адсорбция вирионов на поверхности клеток, проникновение внутрь клетки, депротенинизация, синтез вирусных компонентов, формирование и выход зрелых вирионов из клетки [7].

Репликация вирусной РНК происходит в цитоплазме клеток в полимеразных репликативных комплексах 70S, обнаруженных на гладких мембранах цитоплазматических вакуолей, которые образуются в процессе инфекции. Эти репликативные комплексы состоят из вирусной РНК, полимеразы и четырех видов клеточных белков [5, 7].

Заражение пикорнавирусами вызывает подавление синтеза клеточных макромолекул: белка, РНК и ДНК. Репликация клеточной ДНК подавляется из-за нарушения синтеза структурных и функциональных белков (ферментов), возникающего в результате репродукции вируса ящура на мембранах эндоплазматической сети клеток. Вопрос о механизмах ингибирования синтеза клеточных белков пикорнавирусами является одним из наиболее дискуссионных [5, 7].

Вирус ящура, как и большинство пикорнавирусов, вызывает в клетках характерные цитопатические изменения. В эндоплазматической сети зараженных клеток появляются мембранные везикулы, количество которых постепенно возрастает. Из-за нарушения проницаемости наружной плазматической мембраны на поздних стадиях репродукции вируса происходит утечка внутриклеточных компонентов, сопровождающаяся сморщиванием клеток [7].

Классический вирусный цикл делится на две части: эклипс-фаза, которая наблюдается в период между инфицированием чувствительных клеток и появлением первых вирионов, – до 2,5 ч; во второй фазе количество вирионов увеличивается, и клетка разрушается через 16–20 ч [5].

Проточная цитометрия – это современный метод, обеспечивающий быстрый, качественный и мульти-

параметрический анализ клеток и получивший широкое распространение в таких областях медицины, как иммунология, фармакология, цитология, онкология, гематология, генетика, инфекционные болезни [1, 4]. Методом проточной цитометрии можно получать самые разные данные: определять содержание в клетке ДНК и РНК, суммарное количество белков и количество специфических белков, узнаваемых моноклональными антителами, исследовать клеточный метаболизм (например, измерять внутриклеточный рН), изучать транспортировку ионов кальция и кинетику ферментативных реакций [6].

У каждой клетки есть период существования: от момента ее образования путем деления материнской клетки до собственного деления или гибели. Этот период называется клеточным циклом. Сам клеточный цикл составляют два периода: 1) период клеточного роста, называемый интерфаза, и 2) период клеточного деления, называемый фаза М (от греческого слова *μήτος* – нить). В свою очередь, в каждом периоде выделяют еще 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.

В интерфазе выделяют фазу G₁, фазу S и фазу G₂. Период интерфазы, когда происходит репликация ДНК клеточного ядра, был назван фазой S (от слова *synthesis*).

Нужно отметить, что в интерфазе (в основном в S-фазе) происходит не только репликация ДНК, но и основной биосинтез структурных и функциональных белков клетки.

Период между фазой М и началом фазы S обозначен как фаза G₁ (от слова *gap* – промежуток), а период между концом фазы S и последующей фазой М – как фаза G₂ [3].

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 + М на разных этапах культивирования.

Таблица
Количество пораженных клеток ВНК-21/2-17 в процессе культивирования вируса ящура

Концентрация живых клеток (млн/мл)	Время (часы)	рН	% поражения клеток
4,0	0	7,34	0
4,0	1	7,33	0
4,0	2	7,29	0
4,0	3	7,32	0
3,84	4	7,28	4
3,04	6	7,25	26
2,20	7	7,40	45
1,32	8	7,50	67
0,72	9	7,51	82
0,36	10	7,56	91

В задачу наших исследований входило изучение динамики трансформации ДНК клеток ВНК-21/2-17 при репродукции в них вируса ящура.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали:

- клетки ВНК-21/2-17, авторское свидетельство СССР № 240289, 1986 г.;
- вирус ящура штамма «Азия-1 Шамир/Израиль 3/89»;
- культиваторы металлические рабочим объемом 1800 дм³(КМ);
- проточный цитометр Accuri C6;
- набор для работы с цитометром BD Cyclents;
- набор для определения ДНК клеток C6 Flow Cytometer Fluid Kit.

Пробы отбирали каждый час в течение всего времени репродукции вируса ящура. Концентрацию клеток ВНК-21/2-17 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови (модель 851), соответствующей ТУ 64-1-816-84. К 1 см³ клеточной взвеси добавляли равный объем 0,2%-го раствора трипановой сини, тщательно перемешивали и заправляли в камеру. Количество клеток в 1 см³ суспензии определяли по формуле [4]:

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

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

Подсчет проводили при 10-кратном увеличении микроскопа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамику репродукции вируса определяли по следующим показателям:

- зависимость процента поражения клеток от времени репродукции вируса;
- изменения апоптоза и дебриса;
- изменение стадий (времени) клеточного цикла (G₁, S, G₂ + M).

При культивировании водородный показатель (рН) суспензии и процент поражения клеток ВНК-21/2-17 контролировали каждый час.

Предпринята попытка изучения изменений, происходивших в разные фазы клеточного цикла при культивировании вируса ящура в клетках суспензионной линии ВНК-21/2-17. В стандартных оптимальных условиях интактные популяции по фазам клеточного цикла распределены так: G₁ – 15–20%, G₂ + M – 8–10%, S – 65–75%; количество полиплоидных клеток составляет до 4%, а детритных – 1–4% [2].

В таблице отображена стандартная динамика цитолиза (разрушения) клеток исследуемой клеточной линии при репродукции вируса ящура. В оптимальных условиях (рН не ниже 7,25) основная популяция клеток ВНК-21/2-17 разрушалась за 9–24 ч в зависимости от штамма вируса (до 91% всей популяции).

При сравнении количества клеток, находившихся в апоптозе-дебрисе и в фазе G₁, установили некоторую синхронность между этими фазами: к 3 ч культивирования вируса фаза G₁ сократилась на 15–17%, на такую же величину увеличивался и апоптоз, затем выделялся пик уменьшения G₁ (6 ч) и увеличения апоптоза в эти

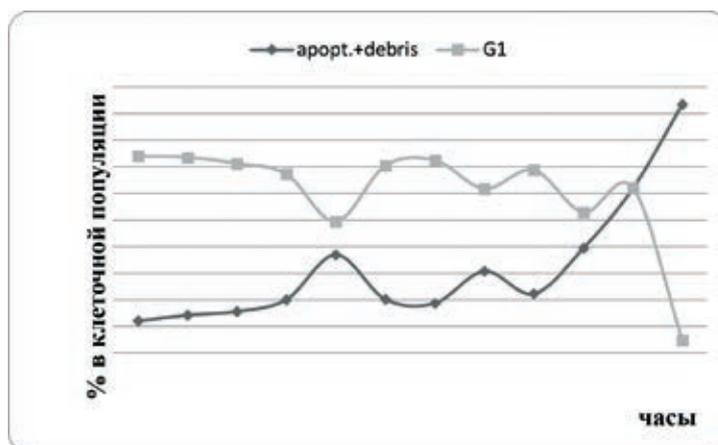


Рис. 1. Изменение процентного соотношения клеток, находившихся на стадиях апоптоза-дебриса и фазы G₁, в культуре ВНК-21/2-17 при репродукции вируса ящура

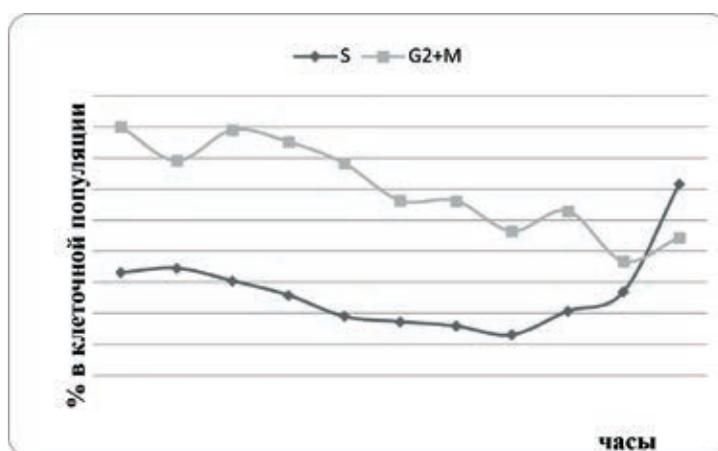


Рис. 2. Изменение процентного соотношения клеток, находившихся на стадиях S и G₂ + M, в культуре ВНК-21/2-17 при репродукции вируса ящура

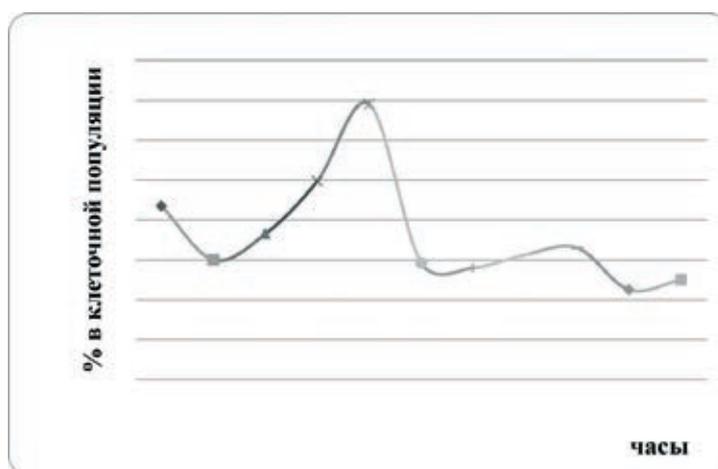


Рис. 3. Изменения количества полиплоидных клеток в культуре ВНК-21/2-17 при репродукции вируса ящура

же сроки. После 9 ч культивирования лавинообразно рос апоптоз и гибли клетки (рис. 1). Такая синхронность в динамике вышеуказанных стадий, вероятно, опреде-

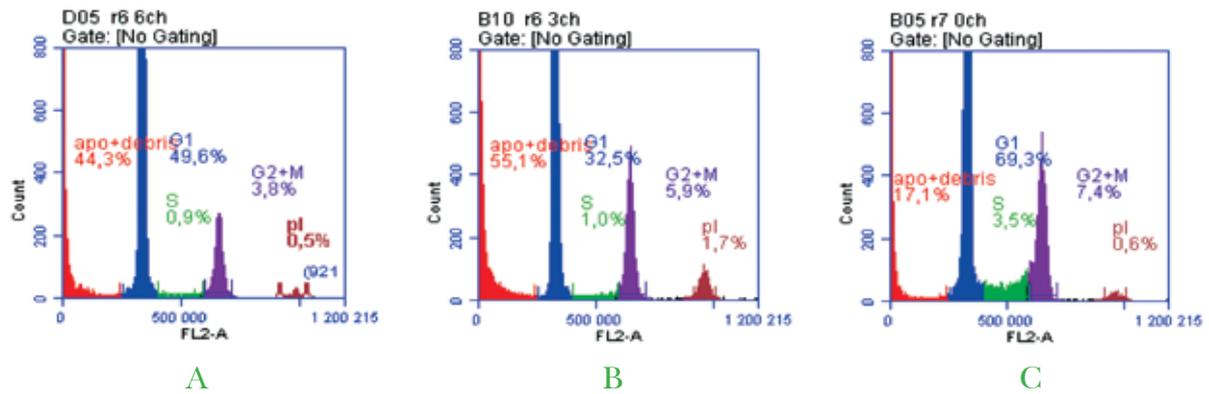


Рис. 4. ДНК-гистограмма клеток ВНК-21/2-17 при репродукции в них вируса ящура сразу после заражения (А), через 3 ч (В), через 6 ч (С) культивирования

ляется повышенной чувствительностью диплоидных клеток к вирусу ящура и быстрой деградацией клеточных мембран до дебриса.

При визуальном определении степени поражения клеток в камере Горяева также установлено, что к 6-му ч культивирования репродукция вируса ящура стала проходить очень интенсивно (табл.). Динамика разрушения популяции по времени совпадала с количеством клеток в апоптозе и количеством мертвых клеток, окрашенных трипановой синью.

Известно, что репликация РНК вируса ящура, в зависимости от вида клеточной культуры, начинается приблизительно через 60–90 мин после заражения. В клетках ВНК-21/2-17 концентрация вируса достигает максимума через 160–170 мин, а зрелые вирусные частицы обнаруживаются приблизительно через 30 мин после начала синтеза РНК и образования вирусспецифических полипептидов [7].

В данных опытах скачок апоптоза и дебриса наблюдался через 3 ч, который, вероятно, совпадал по времени с пиком синтеза вирусспецифической РНК, образования провирионов и частичного образования зрелых вирусных частиц. Через 7–9 ч наблюдался процесс тотального разрушения клеток с выходом из них в суспензию основной массы зрелых вирионов.

В клеточном цикле интактной популяции ВНК-21/2-17 также преобладала диплоидная фаза клеточного цикла (G_1), 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 [2]. Также в период G_1 -фазы клетки начинали увеличиваться в размерах, активировались мРНК и ферменты, необходимые для будущей репликации ДНК.

Количество клеток, находившихся в фазе G_1 в зараженной вирусом культуре, поддерживалось на уровне 60–75% на протяжении основного времени репродукции вируса, т. е. инфицированные вирусом клетки служили источником энергии и материалом для синтеза вирусных компонентов, а также для сборки цельных вирионов. Это было отмечено и А. П. Пономаревым и соавт. [5].

Переход от диплоидной фазы G_1 в синтетическую (S-фазу) является одной из контрольных точек клеточного цикла. В зависимости от количества питательных веществ и энергии, а также от внешних факторов куль-

тивирования клетка «принимает решение» – вступать в клеточный цикл или же перейти в неделящееся состояние покоя, известное как G_0 -фаза, которая переходит в апоптоз. Основным событием S-фазы является репликация ДНК [3].

Тот факт, что процент клеток, находившихся в S-фазе, при репродукции вируса линейно уменьшался в течение 6 ч (рис. 2), свидетельствует о том, что клетки, находившиеся в этой фазе, также участвовали в репродукции вируса. Через 6 ч репликации вируса количество клеток в S-фазе возрастало линейно вплоть до конца репродукции, что коррелировало с двумя небольшими пиками G_1 и одним пиком G_2 (рис. 1, 2). Из этого следовало, что тетраплоидная фаза G_2 и диплоидная G_1 к концу культивирования, вероятно, пополнялись за счет активизации S-фазы и впоследствии быстро разрушались под действием вируса.

G_2 -фаза – последняя из трех последовательных фаз интерфазной стадии клеточного цикла – вместе с митотической фазой образовывала тетраплоидную популяцию. В интактных клетках ВНК-21/2-17 на фазу подготовки к митозу и сам митоз приходилось от 2 до 18% всей популяции [2], а в инфицированной вирусом ящура культуре – от 3,68 до 8,0% (рис. 2). Вероятно, это было связано с тем, что ингибировались общий биосинтез и функции «клетки-хозяина» в результате биосинтеза компонентов вируса ящура.

С помощью графика изменения количества полиплоидных клеток можно судить о дополнительном механизме действия вируса ящура на клетки: в первые 3 ч количество их увеличивалось, до конца культивирования они полностью не исчезали. Это явление свидетельствовало о частичной резистентности полиплоидных клеток к вирусу (рис. 3).

Очень информативны ДНК-гистограммы клеток ВНК-21/2-17 при репродукции в них вируса ящура после начала заражения и через 3 и 6 ч культивирования (рис. 4). Они поясняют графики, представленные на рисунках 1–3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при изучении динамики изменений, происходивших в ДНК инфицированных вирусом ящура клеток ВНК-21/2-17, замечено, что через 3 и 6 ч после заражения в клеточной популяции происходило резкое увеличение процента клеток в процессе апоп-

тоза и дебриса. Это коррелировало с количеством мертвых клеток, выявленных с помощью окраски трипановой синью. Затем разрушение клеток приобретало резкий экспоненциальный характер, к 10 ч культивирования вируса процент поражения клеток составлял 90–91%.

Выявлено, что основной мишенью для вируса ящура являлись клетки, находившиеся в G_1 -фазе, которые полностью разрушались к концу культивирования.

Во время фазы $G_2 + M$ не наблюдалось лавинообразного разрушения клеток, неразрушенные клетки были в дальнейшем задействованы в фазе G_1 .

Полиплоидные клетки, которые образовывались в процессе культивирования вируса, были частично резистентны к ящуру и, вероятно, обладали наименьшей чувствительностью к нему. Увеличение количества таких клеток при появлении признаков цитопатического действия свидетельствовало о проявлении механизма слияния клеток под действием вируса.

Проведенные исследования цитопатического действия вируса ящура в клетках ВНК-21/2-17 показали, что одним из направлений оптимизации производства культуральных вакцин может быть применение фактора торможения пролиферации на определенной фазе клеточного цикла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Войткова В. В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 6 (76), ч. 1. – С. 220–225.
2. Исследование клеточного цикла линии ВНК-21/2-17 методом проточной цитометрии / М. А. Шевченко, М. Н. Гусева, Д. В. Михалишин [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 4. – С. 58–62.
3. Клетки / под ред. Б. Льюин [и др.]. – М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011. – 951 с.
4. Основные этапы разработки и применения метода проточной цитометрии в ФГУ РНЦРХТ / А. С. Ягунов, А. В. Карташев, С. В. Токалов, Л. Н. Киселева // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54, № 4. – С. 494–497.

5. Пономарев А. П., Узюмов В. Л., Груздев К. Н. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. – Владимир: Фолиант, 2006. – 250 с.

6. Эффективность метода проточной цитометрии в изучении механизмов репарации клеток ВНК-21 в процессе культивирования и криоконсервирования / Б. Л. Манин, В. Т. Ночевный, С. В. Хайдук, В. Н. Ласкавый // Ветеринарна медицина: міжвід. тем. наук зб. – Харків, 2011. – Вип. 95. – С. 66–70.

7. Ящур: монография / А. Н. Бурдов, А. И. Дудников, П. В. Малеярец [и др.]; под ред. А. Н. Бурдова. – М.: Агропромиздат, 1990. – 320 с.

REFERENCES

1. Voitkova V. V. Apoptosis study using flow cytometry (review) [Izuchenie apoptoza metodom protochnoj citofluometrii (obzor literatury)]. *Acta Biomedica Scientifica*. 2010; 6 (1): 220–225 (in Russian).
2. Study of BHK-21/2-17 cell line cycle using flow cytometry technique [Issledovanie kletchnogo cikla linii VNK-21/2-17 metodom protochnoj citometrii]. M. A. Shevchenko, M. N. Guseva, D. V. Mikhailishin [et al.]. *Veterinary Science Today*. 2017; 4: 58–62 (in Russian).
3. Cells [Kletki]. ed. by B. Lewin [et al.]. M.: BINOM, Laboratoria znaniy, 2011 (in Russian).
4. Basic stages of flow cytometry technique development and use in the FGI RRCRST [Osnovnye etapy razrabotki i primeneniya metoda protochnoj citometrii v FGU RNCRHT]. A. S. Yagunov, A. V. Kartashev, S. V. Tokalov, L. N. Kiseleva. *Problems in Oncology [Voprosi onkologii]*. 2008; 54 (4): 494–497 (in Russian).
5. Ponomarev A. P., Uzyumov V. L., Gruzdev K. N. Foot-and-mouth virus: structure, biological, physical and chemical properties [Virus yashchura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svojstva] Vladimir: Foliant, 2006 (in Russian).
6. Efficacy of flow cytometry in BHK-21 cell restoration mechanism study during culture and cryopreservation processes [Effektivnost' metoda protochnoj citometrii v izuchenii mekhanizmov reparacii kletok VNK-21 v processe kul'tivirovaniya i kriokonservirovaniya]. B. L. Manin, V. T. Nochevny, S. V. Haidukov, V. N. Laskavy. *Veterinarna medicina: mizhvid. tem. nauk. zb. Kharkiv*, 2011; 95: 66–70 (in Russian).
7. Foot and mouth disease: monography [Yashchur: monografiya]. A. N. Burdov, A. I. Dudnikov, P. V. Malyarets [et al.]; ed. A. N. Burdov. M.: Agropromizdat, 1990 (in Russian).

Поступила 05.06.18

Принята в печать 29.11.18