

Адаптация вируса кори, штамма Edmonston-B, к клеткам CaCo-2

З.А. Каралян, Н.К. Гаспарян, С.Р. Давидян, М.Г. Гаспарян

*Лаборатория вирусологии, Онкологический научный центр МЗ РА,
кафедра медицинской биологии и генетики ЕрГМУ им. М. Гераци*

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: вирус кори штамм Edmonston-B, культура аденокарциномы толстого кишечника человека – CaCo-2

Коревой вакцинный штамм Edmonston B и его дериваты – штаммы Mогaten и Шварц весьма широко применяются в клинике в качестве живых противокоревых вакцин. Эти вирусы способны реплицироваться в различных клеточных системах – как тканевых, так и перевивных клеточных линиях. Показана также способность этих штаммов к длительной персистенции и их влияние на генетический аппарат клеток кишечника человека [2, 4]. Влияние вируса кори на клетки имеет ряд особенностей и зависит от штамма, степени адаптации вируса, дозы и других факторов [3].

Известно, что основная часть живых коревых вакцин, включая вышеупомянутые штаммы, получена с помощью длительной репликации вируса на первичных культурах клеток куриных эмбрионов. Вследствие этого адаптация их к человеческим перевивным культурам, несмотря на широкое применение в современной научной практике, имеет некоторые особенности. С учетом того, что в современной литературе мало уделяется внимания связи морфологических изменений с титрами накопления вируса [1], мы сочли актуальным сопоставить динамику высвобождения вируса в среду с динамикой морфологических изменений клеточной культуры.

Цель настоящей работы – раскрыть методику адаптации и характер цитопатического действия вируса кори штамма Edmonston-B на перевивных клетках аденокарциномы толстого кишечника человека – CaCo-2, а также выявить связь морфологических изменений в зараженных клетках с динамикой вирусных титров.

Материал и методы

Живая коревая вакцина, штамм Edmonston-B. Для получения острой вирусной инфекции вирус использовался в дозе 0.01 TCD₅₀ на клетку. Во всех клеточных культурах в качестве исходного употреблялся 48-

часовой монослой. Инфекция, как и контроль, проводилась при 37°C. Вирусный титр рассчитывался по методу Kärber. Изучение всех параметров проводилось в сроки – 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 ч после инфицирования.

CaCo-2 - трансформированная перевивная линия аденокарциномы толстого кишечника человека. Клетки культивировались в среде Eagle с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки.

Посевная доза – 2×10^5 клеток/мл. Монослой получали через 48 ч. после начала пассирования (клетки были любезно предоставлены Dr Pascale Galea Trophos). Окараска клеток проводилась стандартным способом галлоцианин-хромовыми квасцами (РНК специфичная).

Результаты и обсуждение

На 48-часовой монослой CaCo-2 наносились исходные разведения вируса. Клетки вместе с вирусом выдерживались до 9 суток с момента инфицирования. I пассаж вируса не дал видимых изменений клеток по сравнению с соответствующими контрольными пассажами. Часть надосадочной жидкости с I пассажа нанесли на 48-часовой монослой интактных КЛЕТОК CaCo-2 – II пассаж. Во II пассаже, начиная с 6–7 суток после заражения, нами определялся цитопатический эффект вируса в виде формирования симпластов. После этого в течение 2–3 суток (на 8–10 сутки после заражения) начиналась дегградация монослоя. Начиная с III пассажа, вирус регулярно выделялся в надосадочной жидкости в титрах 2.5–3.5 TCD₅₀/мл. С III пассажа время образования симпластов сократилось до 48 ч., а деструкция монослоя начала наблюдаться уже к 7–8 суткам после заражения. В дальнейшем подобные показатели адаптированный вирус демонстрировал стабильно. Динамика изменений титра вируса после становления инфекции представлена на рис 1.

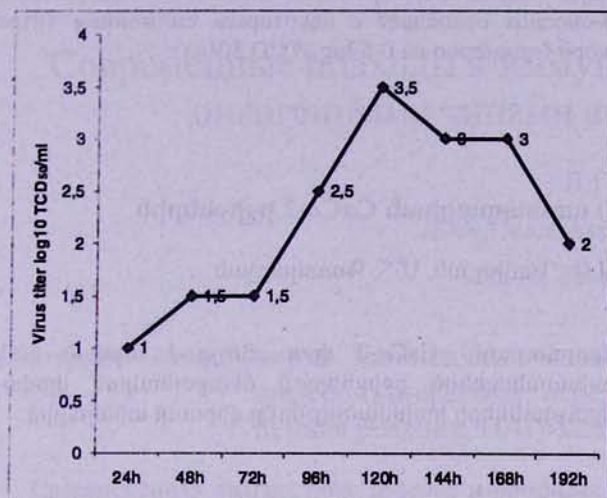


Рис.1 Динамика титров вируса кори (Edmonston-B) на клетках CaCo-2

По сравнению с ранними пассажами после стабилизации инфекции, начиная с IV–V пассажей, цитопатическое действие вируса начало наблюдаться в более ранние сроки – с 3–5 суток, деградация монослоя начиналась уже к 6–8 суткам после заражения. Анализ цитопатогенного действия вируса показал, что образование симпластов не является единственным его действием. Наряду с образованием многоядерных формаций на более поздних сроках (6–8-е сутки) наблюдается разрушение клеток, содержащих одно ядро.

Таблица

Количество клеток культуры CaCo-2 на единицу площади в контроле и под действием вируса кори

Время инкубации, ч		Среднее число клеток на 0,01мм ²	
Контр.	действие вируса на 48-часовой монослой	контроль	вирус
48	-	10.0±0.8	-
60	-	15.1±0.9	-
72	24	24.6±0.9	23.5±0.6
96	48	38.2±1.2	24.3±0.8
120	72	22.3±0.6	27.7±0.9
144	96	32.6±0.8	31.0±0.7
168	120	18.7±0.1	30.9±0.6
192	144	20.4±0.9	17.4±0.6
216	168	19.1±0.8	18.0±0.6
240	192	31.5±0.6	6.7±0.8*

* – ниже по сравнению со всеми предыдущими показателями ($p < 0.001$)

Формирование многоядерных клеток – одно из проявлений цитопатического действия вируса кори, причем характер и интенсивность симпластообразования во многом определяет исход инфекционного процесса [1]. Изучение инфицированного монослоя клеток CaCo-2 выявило формирование симпластов начиная с 48 ч после заражения. Количество симпластов резко возрастало со 2–4-ых суток, а деградация монослоя начиналась к 6–8 суткам после заражения. Количество ядер в симпластах колебалось от 3–5 до 30–35. Симпласты с максимальным числом ядер наблюдались к 4–5-ым суткам после инфицирования. Основная часть симпластов была небольшой по размеру и содержала от 5 до 10 ядер.

На рис 2 и 3 приведена контрольная популяция клеток CaCo-2 и типичный симпласт, полученный к 120 ч после заражения культуры.

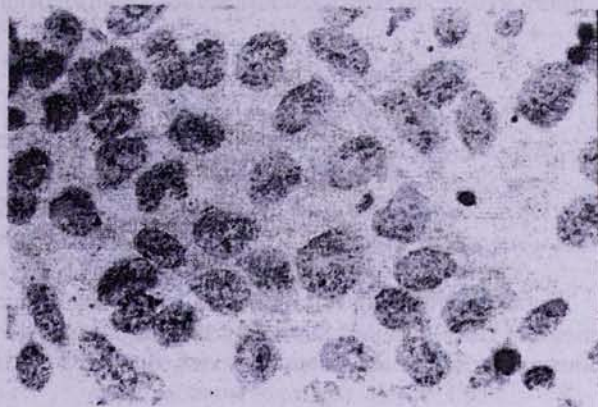


Рис 2. Контроль CaCo-2. 168-часовая инкубация. х 900, окраска галлоцианин хромовыми квасцами

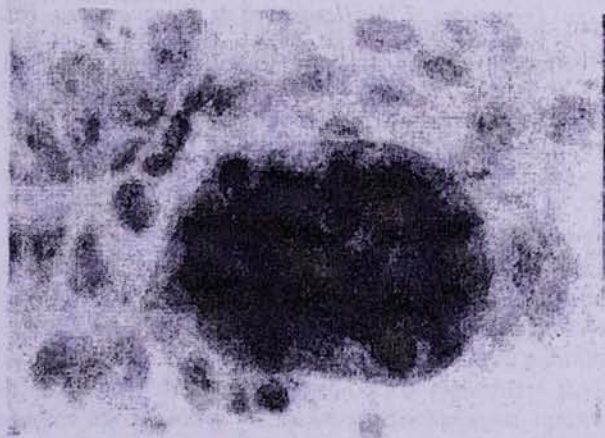


Рис 3. Завершающая стадия формирования сингиция. 120 ч с момента заражения. х 900, окраска галлоцианин хромовыми квасцами

Таким образом, вирус сравнительно легко адаптируется к клеткам CaCo-2 и дает симпластобразующую и цитодеструктивную формы инфекции. Максимальный пик вирусного титра приходится на завершаю-

щую стадию формирования симпласта, а деградация монослоя совпадает с некоторым снижением титра кори (примерно на $0.5 \log_{10} \text{TCD } 50/\text{мл}$).

Կարմրուկի վիրուսի շտամ (Edmonston B) ադապտացիան CaCo-2 բջիջներին

Զ. Ա. Կարալյան, Ն.Կ. Գասպարյան, Ս.Ռ. Դավիդյան, Մ.Ն. Գասպարյան

Աշխատանքում ցույց է տրված կարմրուկի վիրուսի շտամ՝ Edmonston B-ի ադապտացիայի մեթոդիկան և բջջաախտաբանական ազդեցության բնույթը մաքուր հաստ աղու ադենոկարցինոմայի բջջային

կուլտուրայի՝ CaCo-2 վրա: Ցույց է տրված նաև ախտահարված բջիջներում ձևաբանական փոփոխությունների կախվածությունը վիրուսի տիտրերից:

Adaptation of vaccine strain of the measles virus Edmonston B to CaCo-2 cells

Z.A. Karalyan, N.K. Gasparyan, S.R. Davidyan, M.H. Gasparyan

The method of adaptation and the type of cytopathic action of the vaccine strain of the measles virus (Edmonston B) on the continuous cell line CaCo-2 is

shown in the article. It was also demonstrated the dependence of morphological changes in the cells on the titers of the virus.

Լիտերատուրա

1. Гетманова Т.Н., Нечаева Е.А., Колокольцева Т.Д. Вопросы вирусологии, 2000, 5, 34, 7.
2. Blau D.M., Compans R.W. Virology, 1997, May 12;231 (2):281.
3. Griffin D.E. In: D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields virology, 4th ed. 2001, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 1401.
4. Sinn P.L., Williams G., Vongpunsawad S., Cattaneo R., McCray P.B. Jr. J. Virol., 2002 Mar;76(5):2403.