



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46839 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61K 39/00  
A61K 39/21

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ РЕТРОВІРУСУ

1

(21) u200906756  
(22) 26.06.2009  
(24) 11.01.2010  
(46) 11.01.2010, Бюл.№ 1, 2010 р.  
(72) БУЧАЦЬКИЙ ЛЕОНІД ПЕТРОВИЧ, МАТВІЄН-  
КО НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА  
(73) КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

2

(57) Спосіб культивування ретровірусу, що вклю-  
чає його інокуляцію та культивування в чутливій  
біологічній системі, яка містить поживне середо-  
вище для вирощування перевивних клітин з дода-  
ванням фітогемаглютиніну (ФГА), який **відрізня-**  
**ється** тим, що як чутливу біологічну систему  
використовують первинну культуру лейкоцитів і  
культивування проводять в атмосфері вуглекисло-  
го газу.

Корисна модель відноситься до вірусології та біотехнології, зокрема до способу культивування ретровірусів в первинній культурі лейкоцитів і може бути використаний для отримання імунобіологічних препаратів та діагностиків. В цій галузі прийнято використовувати такі терміни і скорочення:

ФГА - фітогемаглютинін

Пасаж - пересівання

ЦПД - цитопатична дія

МФА - метод флуоресціюючих антитіл

чутлива біологічна система - це біологічна система (культура клітин, лабораторні тварини) в якій відбувається репродукція вірусу.

Відомий спосіб одержання первинних культур клітин для репродукції вірусів різних типів [1]. Спосіб передбачає: інокуляцію, культивування вірусу, визначення його титру.

Недоліком відомого способу є неможливість культивування деяких ретровірусів через відсутність на поверхні клітини рецепторів, чутливих до цих вірусів. Ця обставина стримує конструювання ефективних діагностиків для виявлення ретровірусів та розробку імунобіологічних препаратів.

Відомий спосіб культивування ретровірусу в чутливих біологічних системах, який передбачає: інокуляцію, культивування вірусу, визначення його титру. Спосіб характеризується постановкою біопроби на чутливих живих об'єктах, проведення циклу репродукції та визначення його титру [2]. Недоліком способу є висока трудомісткість, обумовлена необхідністю роботи з живими об'єктами, що потребує створення певних умов для їх утри-

мання, а також неможливість передбачувати результат через високу загибель живих об'єктів у зв'язку з високою імунною навантаженістю при проведенні експерименту. Це досить часто стає причиною загибелі досліджуваного об'єкту, що робить неможливим визначення у ньому вірусу.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб культивування ретровірусу шляхом використання чутливих біологічних систем, таких як культура лейкоцитів. Завдяки наявності на поверхні клітин, чутливих до ретровірусу рецепторів, забезпечується можливість накопичувати вірус в цій системі в кількості достатній для отримання імунобіологічних біопрепаратів та діагностиків.

Поставлена задача вирішена тим, що у способі культивування ретровірусу, що включає його інокуляцію, культивування в чутливій біологічній системі та визначення інфекційного титру, як чутливу біологічну систему використовують первинну культуру лейкоцитів, яку піддають проліферації в поживному середовищі, який відрізняється тим, що як поживне середовище використовують інкубаційну систему, в яку додатково вносять фітогемаглютинін (ФГА) та вирощують в атмосфері, що містить вуглекислий газ. Створення цієї культуральної системи дозволяє накопичувати ретровіруси в концентрації, достатній для подальшого одержання імунологічних препаратів в біотехнології.

Суть корисної моделі полягає в способі культивуванні ретровірусів в первинній культурі лейкоцитів, що включає отримання культури лейкоцитів з наступною їх проліферацією в пожив-

(13) U

(11) 46839

(19) UA

ному середовищі. Отримання культури лейкоцитів крові проводили згідно з модифікованою нами методиками. Для цього в максимально можливих стерильних умовах відбирали кров в стерильні пробірки, на дно яких було нанесено 1-2 краплини концентрованого гепарину. Пробірки закривали стерильними гумовими пробками та доставляли в лабораторію. Гепаринізовану кров центрифугували протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Перед взяттям надосаду 1 краплину супернатанту пастерівською піпеткою наносили на камеру Гаряєва для підрахунку кількості клітин в 1 мл. суспензії. Для нормального росту клітин концентрація лейкоцитів повинна складати 1,5-2 млн. клітин в 1 мл.

Середовище RPMI вносили в пеніцилінові флакони та в чашки Карреля. Також було додано невелику кількість фетальної сироватки та фітогемаглютиніну. До суспензії лейкоцитів додавали фітогемаглютинін (ФГА) із розрахунку близько 200 мкг/см<sup>3</sup>. Необхідна доза ФГА відповідала 0,1 см<sup>3</sup> озоцину на 10 см<sup>3</sup> клітинної суспензії.

З метою запобігання контамінації культури мікроорганізмами додавали антибіотики (стрептоміцин). Культуру вирощували в атмосфері яка містить 2% вуглекислого газу. Флакони з лейкоцитарною суспензією продували через пастерівську піпетку повітрям легень, щоб бульбашки повітря заповнили весь об'єм флакону, потім його закривали пробкою. Через кожні 12 годин культуру проглядали під світловим мікроскопом.

Можливість здійснення корисної моделі ілюструється таким прикладом, який не обмежує обсяг правової охорони.

#### Приклад 1.

З метою вивчення чутливості вірусу інфекційної анемії коней та підбору оптимальних умов культивування використали культуру лейкоцитів коня. Для адаптації вірусу до культури було проведено ряд сліпих пасажів строком культивування до 7-10 діб.

В процесі щоденного спостереження за ростом культури встановлено, що клітини змінювали свою морфологію, у 20% із них спостерігали збільшення цитоплазми і поява в ній зернистості, набухання ядра. Такі клітини нагадували за своєю будовою юні форми (мієлобласти, полімієлоцити). Через 24 години культивування достовірно диференціювати всі клітини культури було не можливо, за виключенням еозиніфілів, які зберігають характерну зернистість до 3-4 діб.

З метою встановлення можливої цитопатичної дії (ЦПД) вірусу на культуру, проводили щоденні спостереження під малим збільшенням мікроскопу, порівнюючи заражені культури з контролями. При цьому звертали увагу на морфологію клітин, строки прикріплення і відпадання їх від скла, тривалість життя та інші зміни.

Гіпертрофія клітин продовжувалась протягом 2-10 діб культивування: клітини втрачали округлу форму, у частини із них з'являлись виступи цитоплазми - псевдоподії. На 5 добу культивування відбувалось незначне розрідження клітин, деякі з

них зморщувались і відпадали від скла, інші лишались на склі, але були не життєздатними. До кінця строку культивування (10 доба) 50 % клітин, що прикріпились до скла були не життєздатні.

Серійні пасажі культурального вірусу перевіряли за допомогою МФА в непрямій модифікації. При дослідженні накривних скелець під люмінесцентним мікроскопом у флаконах де спостерігалось ЦПД, в цитоплазмі клітин було світіння з інтенсивністю на 3+ та 4+. Результати порівнювались з контрольними зразками.

Для встановлення титру вірусу, вірусмістну культуральну рідину, після трьохкратного заморожування відтаювання, центрифугували впродовж 30 хвилин при 3000 g. Надосадову рідину фасували у флакони по 2,0 см<sup>3</sup> та заморожували при -18 °С. Досліджувані проби розморожували та титрували за нижче наведеною методикою.

Титром вірусу вважали розведення, в якому спостерігали ушкодження клітинного моношару на ++ у 50 % досліджуваних пробірок. Титр виражали в тканинних цитопатичних дозах в 0,5 см<sup>3</sup>.

З даних підрахунків встановлено, що титр вірусу за ЦПД становив:

$$T = 10^{5.16} \text{ ЦПД}_{50} / 0,5 \text{ см}^3.$$

Для перевірки активності вірусу в культурі лейкоцитів адсорбували його з конячими еритроцитами. Гемоліз еритроцитів відбувався після інкубації зі свіжою сироваткою крові коней при температурі 37 °С протягом 30 хв. Еритроцити оброблені 4 од. гемаглютиніну і нерозведеною свіжою сироваткою коней, лізувались на 20 %. Специфічна сироватка, взята від експериментально зараженої тварини, пригнічувала здатність вірусу аглютинувати еритроцити, але гемоліз не гальмувався. Додавання специфічної сироватки до вірусу, що закріпився на еритроцитах, посилював гемоліз.

Було встановлено, що в культурі лейкоцитів відбувається розмноження вірусу з яскраво вираженою цитопатичною дією, що характеризувалась зміною морфології клітин зі значними ділянками ураження клітин, аж до повного порушення моношару. Відмічено, що ЦПД проявлялось на 4-10 добу культивування. Зі збільшенням числа пасажів час прояву ЦПД скорочувався. Встановлено, що культура лейкоцитів коня є найбільш придатною для накопичення вірусу, встановлення його титру та дає можливість отримувати антиген для діагностичних досліджень. Отримані результати підтверджуються літературними даними

Приклад 2. Отримання культури лейкоцитів щук та підбору оптимальних умов культивування культури, вивчення чутливості культури лейкоцитів щук до вірусу, який асоційований з пухлинами у них.

Отримання культури лейкоцитів крові щук проводили згідно методики викладеної вище методики але дещо змінювали її, маючи на увазі те, що будь-які культури клітин риб мають свої особливості.

Флакони ставили в термостат при температурі 18-22 °С. За культурою спостерігали кожні 24 години. Заміну середовища проводили кожні 3 доби. Після 3 пасажів було проведено зараження

культури очищеним за допомогою високошвидкісного багатоступінчатого центрифугування безклітинним фільтратом, який було отримано з пухлин шук.

В процесі щоденного спостереження за ростом культури встановлено, що клітини змінювали свою морфологію, у 20 % із них спостерігали збільшення цитоплазми і поява в ній зернистості, набухання ядра. Такі клітини нагадували за своєю будовою юні форми (мієлобласти, полімієлоцити). Через 24 години культивування достовірно диференціювати всі клітини культури було не можливо, за виключенням еозинофілів, які зберігають характерну зернистість до 3-4 діб. Після 48 годин інкубації в флаконах при перегляді культури відмітили зменшення кількості лейкоцитів в результаті загибелі поліморфоядерних клітин.

З метою встановлення можливої цитопатичної дії (ЦПД) вірусу на культуру, проводили щоденні спостереження під малим збільшенням мікроскопу, порівнюючи заражені культури з контролями. При цьому звертали увагу на морфологію клітин, строки прикріплення і відпадання їх від скла, тривалість життя та інші зміни.

На 2-гу добу культивування лише у 30 % з досліджуваних клітин було помітне ЦПД. На 3-ту

добу культивування ЦПД помітне у 40 %, на 4-ту у всіх флаконах було помітне ЦПД, а у 30 % помітне часткове порушення цілісності моношару. На 5-ту добу культивування моношар у досліджуваних флаконах, а також у контролях почав сповзати, був зібраний і поміщений у морозильну камеру при -20 °С для очистки вірусу. Попередню очистку було проведено трьома етапами заморожування/відтанення. Отже, зміна кольору середовища, порушення моношару, набухання та агрегація клітин свідчить про те, що вірус виділений з пухлин щуки (*Esox lucius*) активно розмножувався в культурі лейкоцитів.

Використання запропонованого методу забезпечує можливість отримання ретровірусів в концентрації достатньої для подальшого одержання імунологічних препаратів в біотехнології.

Література:

1. Новохатский А.С. Тканевые и клеточные культуры в вирусологии и молекулярной биологии. М.: 1979, с. 156.

2. Сюрин В.Н. Конструирование диагностикомов и противовирусных вакцин, современные биотехнологии // Вестник с/х науки.-1986.- № 2.-С. 141-148.