



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 109032

(13) U

(51) МПК

G01N 33/483 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 01135**

(22) Дата подання заявки: **10.02.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.08.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.08.2016, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Дядюн Світлана Терентіївна (UA),
Руденко Адель Вікторівна (UA),
Корніліна Олена Михайлівна (UA),
Іванська Наїля Валєєвна (UA),
Старосила Дар'я Борисівна (UA),
Рибалко Світлана Леонтіївна (UA)**

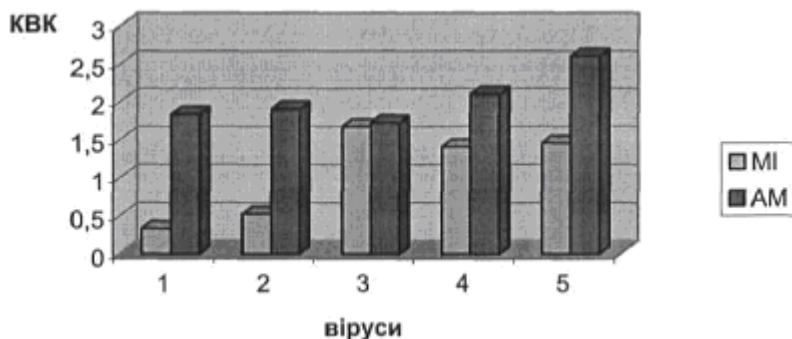
(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ
ХВОРОБ ІМ. Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ",
вул. М. Амосова, 5, м. Київ, 03680 (UA),
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
УРОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053
(UA)**

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МАРКЕРІВ ВІРУСІВ ПРИГНІЧУЮЧИХ ТА СТИМУЛЮЮЧИХ ПРОЛІФЕРАЦІЮ ІНФІКОВАНИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб диференційного визначення маркерів вірусів, пригнічуючих та стимулюючих проліферацію інфікованих клітин, включає культивування клітин. Клітини інфікують, інфіковані клітини інкубують продовж 22-24 год., потім за допомогою мікроскопії проводять дослідження та виявляють зміни мітотичного режиму клітин, визначають мітотичний режим по кількісній цитологічній зміні інфікованих клітин шляхом розрахунку коефіцієнта відхилення від контролю показників мітотичного індексу і аномальних мітозів інфікованих клітин за формулами.



UA 109032 U

Корисна модель належить до медицини та вірусології і може бути використана для диференційного визначення маркерів вірусів, пригнічуючих та стимулюючих проліферацію інфікованих клітин в досліджуваному біологічному матеріалі.

В останні роки особливе місце серед морфологічних досліджень займають роботи, присвячені впливу вірусів на клітинне ділення [1]. Ряд дослідників [2] звернули увагу на те, що вірусні інфекції, які діють на генетичний апарат клітин, можуть викликати порушення хромосомного апарату клітин, що призводить в окремих випадках, до так званих хромосомних хвороб, а також, за даними окремих авторів [3], до пухлинного перетворення клітин.

Відомо, що навіть при гострому інфекційному процесі взаємодія вірусу з клітиною є по суті взаємодією між двома геномами - вірусним і клітинним. При цьому пошкодження генетичного апарату клітини може бути більш або менш глибоким. Наприклад, може відбуватися повне руйнування матеріального субстрату спадковості - клітинної ДНК.

Метод дослідження впливу вірусів на генетичний апарат інфікованих клітин полягає у всебічному вивченні мітотичного режиму цих клітинних культур. При цьому об'єктом вивчення є такі показники, як зміна мітотичної активності, зрушення фаз мітозу, поява патологічних форм клітинного ділення у всіх фазах мітозу: профазі, метафазі, анафазі, телофазі.

Непряме ділення клітин - мітоз є процесом, в ході якого відбуваються складні перетворення ядра, клітинного центру та хроматинового веретена, в результаті чого виникають дочірні клітини, тотожні за генетичною характеристикою. Суттєвість мітозу полягає в рівномірному розподілі генетичного матеріалу, який знаходиться в хромосомах, між дочірніми клітинами. Мітотичний режим поняття збірне. Воно включає такі показники як мітотична активність, кількість патологічних (аномальних) форм мітозу серед клітин, які діляться, переважаючі форми патологічних мітозів.

В дослідженнях [4, 5] показано вплив різних штамів вірусів герпесу на мітотичний режим перещеплюваних культур клітин. Через 24 год. після зараження відбувалось різке падіння мітотичної активності (в контрольних культурах мітотична активність була 12,6 ‰, а в заражених культурах від 2.2 до 4.2 ‰).

В роботі [6] автори встановили, що дія аденовірусів типів 6, 7 і 12 на мітози залежала від множинності інфекції, а також від тривалості циклу репродукції вірусу. При зараженні клітин Hela аденовірусом типу 12 (0,02 ТЦД₅₀ на клітину) спостерігалось зниження мітотичної активності, аж до повного зникнення мітозів вже після 24 год. після зараження.

Встановлено вплив вірусу Сендай на показники мітотичного режиму перещеплюваної культури клітин RES. Так через 24 год. після інфікування спостерігалось різке пригнічення мітотичної активності. В ті ж строки в інфікованих культурах повністю завершувалось симпластоутворення [7]. Однозначні зміни мітотичної активності і ріст кількості патологічних мітозів відмічалися в культурах, заражених малою дозою вірусу (множинність 80 ІД₅₀ на клітину).

Існують також дані щодо впливу вірусу ендемічного паротиту на деякі показники мітотичного режиму клітинних культур. Ще в 1963 р. Залкінд С.Я. показав, що цей вірус викликає особливо різкі зміни хроматинового апарату клітини і появу чисельних неправильних мітозів [8]. Інші автори [9] показали, що вірус ендемічного паротиту викликає в досліджуваних культурах клітин значну проліферацію і збільшення мітотичної активності, яка супроводжується появою значної кількості атипових мітозів.

При дослідженні впливу вірусу поліомієліту на культури клітин встановлено його декомплексаційну дію. Авторам вдалося встановити, що вірус має здатність „мітотичного яду“, який паралізує процес мітозу [10]. А при вивченні клітинної культури СОЦ, зараженої вірусом поліомієліту (тип 3, штам Леон, 100 ТЦД₅₀ /0,2 мл) Чудная Л.М. та ін., (1967) встановили, що перші зміни клітин відмічаються вже через 3-4 год. після інокуляції вірусу. На пізніх стадіях дії вірусу відмічалось порушення анафазі і телофазі мітозу за рахунок затримування ділення в цих фазах [11].

Найближчим до корисної моделі, що заявляється, є спосіб виявлення репродукції вірусів в заражених клітинах шляхом визначення інфекційного титру вірусу та вірусного навантаження, їх інфікування та визначення інфекційного титру [12, 13].

Головним недоліком цих методів є те, що для їх визначення необхідна активна репродукція вірусів в культурах клітин упродовж 3-5 діб, в той час як відповідь клітин на інфікування вірусом призводить до зміни їх мітотичного режиму протягом однієї доби, як при гострій, так і при персистентній вірусній інфекції.

Задача корисної моделі полягає в розробці способу диференційного визначення маркерів вірусів, пригнічуючих та стимулюючих проліферацію інфікованих клітин, по кількісній (цитологічній) зміні мітотичного режиму інфікованих клітин за рахунок визначення коефіцієнта

відхилення від контролю (КВК) показників мітотичного індексу і аномальних мітозів інфікованих клітин у порівнянні з неінфікованими клітинами.

- 5 Поставлена задача вирішується у способі визначення маркерів вірусів, пригнічуючих та стимулюючих проліферацію інфікованих клітин, який включає культивування клітин. Новим є те, що клітини інфікують, інфіковані клітини інкубують продовж 22-24 год., потім за допомогою мікроскопії проводять дослідження та виявляють зміни мітотичного режиму клітин, визначають мітотичний режим по кількісній цитологічній зміні інфікованих клітин шляхом розрахунку коефіцієнта відхилення від контролю (КВК) показників мітотичного індексу (МІ) і аномальних мітозів (АМ) інфікованих клітин за формулами:

$$10 \quad \text{КВК}_{\text{МІ}} = \frac{\text{МІ інфікованих культур}}{\text{МІ неінфікованих культур}},$$

$$\text{КВК}_{\text{АМ}} = \frac{\text{АМ інфікованих культур}}{\text{АМ неінфікованих культур}},$$

де

КВК_{МІ} - коефіцієнт для визначення мітотичного індексу;

КВК_{АМ} - для визначення аномальних мітозів;

- 15 МІ інфікованих культур - мітотичний індекс інфікованих культур;

МІ неінфікованих культур - мітотичний індекс неінфікованих культур;

АМ інфікованих культур - показник аномального мітозу інфікованих культур;

АМ неінфікованих культур - показник аномального мітозу неінфікованих культур;

- та якщо КВК_{МІ} < 0,6; КВК_{АМ} > 1,2 роблять висновок про наявність маркерів вірусів, пригнічуючих проліферацію; якщо КВК_{МІ} > 1,4; КВК_{АМ} > 1,67 роблять висновок про наявність маркерів вірусів, стимулюючих проліферацію.

- 20 Технічним результатом є те, що заявлений спосіб дозволяє швидше (за 24 години) визначити репродукцію вірусів, пригнічуючих проліферацію клітин, та вірусів, стимулюючих проліферацію клітин. Ще однією перевагою цього способу є те, що можна тестувати репродукцію вірусів не тільки при гострих, але й при хронічних та персистентних вірусних інфекціях.

- Методика визначення мітотичного режиму клітин полягає у культивуванні інфікованих вірусом клітин на покривних скельцях, їх фіксації в рідині Шабадаша протягом 30 хв., забарвленні гематоксиліном-еозином, обезводненні клітин спиртами і толуолом, приклеюванні за допомогою канадського бальзаму до предметного скла, а потім за допомогою мікроскопії проводять дослідження щодо виявлення змін мітотичного режиму клітин (мітотичного індексу та аномальних мітозів).

- 30 Приклад 1. Для визначення мітотичного режиму клітин вирощували перещеплювані культури клітин нєврїноми гасєрова вузла щурів (НГВЩ), нирки собаки (MDCK), нирки мавпи (Vero), нирки кроля (RK-13), нирки хом'яка (BHK) на скельцях у лунках планшєту та інфікували наступними вірусами (грипу A/FM/47/H1N1, герпєсу 2 типу ВН, вірусу гепатиту С (ВГС), вірусу їмунодефіциту людини (ВІЛ), папіломи) в розведенні 1:10. Після їнкубації у продовж 24 год. в термостатї з СО₂ скельця з інфікованими вірусами культурами фіксували, як описано вище. Визначення мітотичного їндексу (МІ) і наявність аномальних мітозів (АМ) проводили за допомогою мікроскопа. Для стандартизації результатів дослідження мітотичного режиму інфікованих клітин введено показник - коефіцієнт відхилення від контролю (КВК):

Для визначення мітотичного їндексу (МІ)

$$\text{КВК}_{\text{МІ}} = \frac{\text{МІ інфікованих культур}}{\text{МІ неінфікованих культур}}$$

Для визначення аномальних мітозів (АМ)

$$45 \quad \text{КВК}_{\text{АМ}} = \frac{\text{АМ інфікованих культур}}{\text{АМ неінфікованих культур}}$$

Отримані результати проведених досліджень наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив вірусів на мітотичний режим клітин

Віруси	Клітини	Цитологічні показники			
		Мітотичний індекс, %	КВК	Аномальні мітози, %	КВК
Грип	НГВЩ	5,6±0,17	0,22	35,2±1,06	1,46
	MDCK	11,0±0,33	0,45	33,3±0,99	1,85
	НГВЩ	13,0±0,39	0,44	38,5±1,15	2,1
	НГВЩ	10,0±0,30	0,21	50,0±1,50	1,94
Герпес	RK13	6,0±0,18	0,46	50,0±1,51	2,18
	Vero	6,7±0,20	0,51	48,3±1,44	1,77
	НГВЩ	23,8±0,71	0,61	35,0±1,05	1,80
ВГС	НГВЩ	21,0±0,63	1,60	38,0±1,14	1,8
	НГВЩ	68,1±2,04	1,75	32,1±0,96	1,65
Папілома	ВНК	27,6±0,82	1,18	40,9±1,23	2,6
	ВНК	40,3±1,21	1,7	32,2±0,97	2,0
	ВНК	9,0±0,27	1,04	29,6±0,88	3,3
	ВНК	17,0±0,51	1,9	23,5±0,71	2,6
ВІЛ	НГВЩ	53,3±1,59	1,13	47,2±1,41	1,8
	НГВЩ	50,6±1,51	1,30	38,8±1,16	2,0
	НГВЩ	58,4±1,75	1,78	42,6±1,28	2,42

За результатами визначення впливу вірусів на мітотичний режим клітин, інфікованих вірусами грипу та герпесу, характеризується зниженням мітотичної активності, тобто мітотичного індексу, у 2-5 разів та підвищенням кількості патологічних мітозів від 1,5 до 2,3 разів.

Мітотичний режим клітин, інфікованих вірусами гепатиту С, ВІЛ та папіломи навпаки характеризується підвищенням мітотичного індексу, тобто проліферації клітин та збільшенням кількості аномальних мітозів, тобто цитодеструкції. На Фіг. 1 наведені середні показники КВК мітотичного індексу (MI) та аномальних мітозів (AM) в культурах клітин під впливом вірусів. Результати кількісних показників мітотичного режиму клітин під впливом вірусів представлено на Фіг. 1.

Фіг. 1. Середні показники КВК мітотичного індексу (MI) та аномальних мітозів (AM) в культурах клітин під впливом вірусів: 1 - грипу, 2 - герпесу, 3 - вірусу гепатиту С (ВГС), 4 - ВІЛ, 5 - папіломи.

Таким чином, виявлення репродукції вірусів грипу використовуючи $KVK_{MI} = 0,33$ та $KVK_{AM} = 1,83$; для вірусу герпесу $KVK_{MI} = 0,50$ та $KVK_{AM} = 1,9$. Для вірусу гепатиту С $KVK_{MI} = 1,67$, а $KVK_{AM} = 1,72$. Для ВІЛ $KVK_{MI} = 1,4$, а $KVK_{AM} = 2,1$. Для папіломи $KVK_{MI} = 1,45$, $KVK_{AM} = 2,19$.

Приклад 2.

Для підтвердження специфічності дії вірусної репродукції на мітотичний режим інфікованих вірусами клітин проведені дослідження визначення мітотичного індексу та аномальних мітозів інфікованих клітин в залежності від інфекційного титру вірусів (табл. 2 і 3).

Таблиця 2

Вплив розведень вірусу грипу на мітотичний режим клітин MDCK

Розведення вірусу	Мітотичний режим				Вірус
	MI		AM		
	%	КВК	%	КВК	
10 ⁻¹	9,0±0,27	0,34	44,4±1,33	1,66	+
10 ⁻²	15,0±0,45	0,57	48,1±1,44	1,80	+
10 ⁻³	23,0±0,69	0,88	26,9±0,81	1,00	-
10 ⁻⁴	22,0±0,66	0,84	27,2±0,81	1,01	-
10 ⁻⁵	25,0±0,76	0,96	28,0±0,84	1,04	-
контроль клітин	26,0±0,78		26,7±0,80		-

Таблица 3

Вплив розведень вірусу герпесу на мітотичний режим клітин RK-13

Розведення вірусу	Мітотичний режим				Вірус
	MI		AM		
	%	KBK	%	KBK	
10 ⁻¹	2,0±0,06	0,25	50,0±1,5	1,88	+
10 ⁻²	3,0±0,09	0,37	33,8±1,01	1,27	+
10 ⁻³	3,0±0,09	0,37	33,8±1,01	1,27	+
10 ⁻⁴	3,0±0,09	0,37	33,3±1,02	1,25	+
10 ⁻⁵	4,0±0,12	0,50	36,1±1,08	1,36	+
10 ⁻⁶	5,0±0,15	0,62	40,8±1,22	1,50	+
10 ⁻⁷	7,0±0,21	0,87	28,5±0,86	1,07	-
10 ⁻⁸	8,0±0,24	1,0	27,9±0,84	1,05	-
контроль клітин	8,0±0,24		26,5±0,79		-

Дослідження підтвердили специфічність дії вірусної репродукції на мітотичний режим інфікованих клітин та дозволили визначити коефіцієнти відхилення мітотичної активності та аномальних мітозів для різних доз вірусів грипу і герпесу, а також показники КВК мітотичного індексу та аномальних мітозів, які для вірусів грипу та герпесу визначалась як $KVK_{MI} < 0,6$; $KVK_{AM} > 1,2$. В табл. 4 наведені середні показники KVK_{MI} і KVK_{AM} для вірусів грипу, герпесу, гепатиту С, ВІЛ і папіломи.

Таблица 4

Середні показники KVK_{MI} і KVK_{AM} для вірусів грипу, герпесу, гепатиту С, ВІЛ і папіломи.

Віруси	Мітотичний режим	
	KVK_{MI}	KVK_{AM}
Грип	0,33±0,001	1,83±0,055
Герпес	0,52±0,016	1,9±0,057
Гепатит С	1,67±0,050	1,72±0,052
ВІЛ	1,40±0,042	2,1±0,063
Папілома	1,45±0,044	2,6±0,078

Таким чином, нами пропонується новий спосіб визначення маркерів вірусів, пригнічуючих та стимулюючих проліферацію інфікованих клітин, по визначенню коефіцієнта відхилення від контролю (КВК) показників мітотичного індексу і аномальних мітозів інфікованих клітин у порівнянні з неінфікованими клітинами, які при зараженні вірусом грипу та герпесу становлять: $KVK_{MI} < 0,6$; $KVK_{AM} > 1,2$; при зараженні вірусами гепатиту С, ВІЛ і папіломи $KVK_{MI} > 1,4$; $KVK_{AM} > 1,67$.

Джерела інформації:

1. Блюмкин В.Н., Жданов В.М. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток // М., Медицина. - 1973. - 268 с.

2. Дорофеев В.М., Борисоглебская Н.В., Залкинд С.Я./ в кн. Морфология цитопатогенного действия // М. - 1963. - 40 с.

3. Зильбер Л.А. Вирусно-генетическая теория возникновения опухолей. М., 1968, 246 с.

4. Блюмкин В.Н., Монастырева Л.А. Методические основы изучения патологических митозов в клеточных культурах, зараженных вирусами М. «Вопр. вирусол.». - 1971. - № 4. - С. 475-478.

5. Шубладзе А.К., Маевская Т.М., Блюмкин В.Д., Кобуру А.Д. Вопр. вирусол. - 1967. - № 3. - С. 305.

6. Стопчанская А.Г., Маликова М.В., Олейник Г.И. и др.// Материалы конференции по патологии клетки. - М. - 1967. - 450 с.

7. Блюмкин В.Н., Жданов В.М., Петерсон О.П. и др., Влияние вируса осповакцины на митотический режим клеточных культур RES // Докл. АН СРСР. - 1967. - № 175. - С. 938-941.

8. Залкинд С.Я., Глан П.В. Влияние вирусной инфекции на размножение клеток однослойной культуры./ в кн. «Регенерация и клеточное деление» // М. - 1967. - С. 153-156.

9. Максимович Н.А., Белкина Э.Н., Гилевич Э.В. и др., Материалы конференции по патологии клетки // М. - 1967. - 10 с.

10. Пигаревский В.Е. Гистология и вопросы патогенеза гриппа // М. - 1964. - 232 с.

11. Чудная Л.М., Некрашевич А.Б., Шехтер Н.И. Материалы конференции по патологии клетки // М. - 1967. - 180 с.

12. Горбунова А.С., Соколов М.И. Руководство по лабораторной диагностике гриппа, парагриппозных и аденовирусных заболеваний // М., "Медгиз". - 1960. - 167 с.

13. PCR: BIOS Essential techniques / Ed. J.F.Burke. - New-York: John Wiley and Sons, 1996. - 153 p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб диференційного визначення маркерів вірусів, пригнічуючих та стимулюючих проліферацію інфікованих клітин, що включає культивування клітин, який **відрізняється** тим, що клітини інфікують, інфіковані клітини інкубують продовж 22-24 год., потім за допомогою мікроскопії проводять дослідження та виявляють зміни мітотичного режиму клітин, визначають мітотичний режим по кількісній цитологічній зміні інфікованих клітин шляхом розрахунку коефіцієнта відхилення від контролю (КВК) показників мітотичного індексу (MI) і аномальних мітозів (AM) інфікованих клітин за формулами:

$$КВК_{MI} = \frac{MI \text{ інфікованих культур}}{MI \text{ неінфікованих культур}},$$

$$КВК_{AM} = \frac{AM \text{ інфікованих культур}}{AM \text{ неінфікованих культур}},$$

де

КВК_{MI} - коефіцієнт для визначення мітотичного індексу;

КВК_{AM} - для визначення аномальних мітозів;

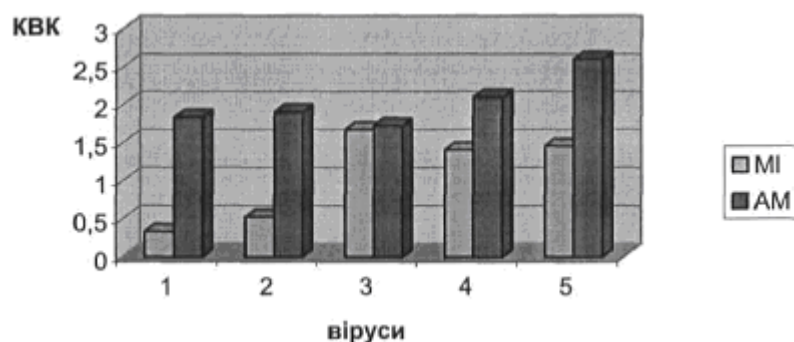
MI інфікованих культур - мітотичний індекс інфікованих культур;

MI неінфікованих культур - мітотичний індекс неінфікованих культур;

AM інфікованих культур - показник аномального мітозу інфікованих культур;

AM неінфікованих культур - показник аномального мітозу неінфікованих культур;

та якщо КВК_{MI} < 0,6; КВК_{AM} > 1,2 роблять висновок про наявність маркерів вірусів, пригнічуючих проліферацію; якщо КВК_{MI} > 1,4; КВК_{AM} > 1,67 роблять висновок про наявність маркерів вірусів, стимулюючих проліферацію.



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601