Цитопатологические изменения в культуре клеток при культивировании вируса мешотчатого расплода пчел

Cytopathological changes in the cell culture at cultivation of bee, ssacbrood virus

Калинин А.Г.

г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-3-14
УДК 619:578.085.23.002

Ключевые слова: культура клеток, монослой, пчелы, вирус мешотчатого расплода,

Key words: bees, cell culture, a monolayer, sacbrood virus

Резюме. Использованы клеточные культуры разного видового и тканевого происхождения для изучения цитоморфологических изменений, вызываемых вирусом мешотчатого расплода. Выявлены одинаковые цитоморфологические изменения в различных клеточных штаммах.

Summary. Cell cultures of different species and tissue origin were used to study the cytomorphological changes caused by the sacbrood virus. The same cytomorphological changes were observed in different cell strains.

Пчеловодство – важная отрасль сельского хозяйства. Пчелы играют большую роль в экономике и продовольственном обеспечении страны. Их значение состоит не только в получении продукции пчеловодства (меда, пыльцы, воска, прополиса, маточного молочка, пчелиного яда и т. д.), но и, что гораздо важнее – в опылении сельскохозяйственных культур. Урожай таких культур, как подсолнечник, морковь, яблоня и многих других на 100% зависит от опылителей, среди которых 90% занимают пчелы (Гробов, О.Ф. с соавт., 1987; Конусова О.Л. с соавт., 2010; Скребнева Л.А. с соавт., 2015; Singh D.A., 2000; Oldroyd B.P. et al., 2009).

Однако, пчелы восприимчивы к разнообразным патогенам, таким как бактерии, грибы, простейшие, паразиты, вирусы. Известно более 20 вирусов – возбудителей заболеваний пчел. Одним из них является вирус мешотчатого расплода пчел (ВМР), вызывающий заболевание пчелиного расплода с характерными клиническими признаками (Батуев Ю.М., 2010; Сотников А.Н. с соавт., 2014; Coffey M.F. et al., 2013; Castle D., 2013).

Долгое время использовались различные методы исследования вирусов пчел, такие как РДП, РСК и др. (Гробов О.Ф. с соавт., 1989; Огурцов А.Ф., 2005; Батуев Ю.М. с соавт. 2010), однако метод исследования *in vitro* не использован

широко для понимания патогенетического процесса действия вируса.

Ранее проведены исследования по изучению действия ВМР в культурах клеток различных животных (Смирнова Н.И., 1974; Калинин А.Г. с соавт., 2016, 2017; Carrillo-Tripp J. et al., 2016). Однако недостаточно данных по более углубленному изучению вируса мешотчатого расплода в культурах клеток различного видового и тканевого происхождения.

При изучении возможности репликации вируса мешотчатого расплода пчел в клеточных культурах куриных и мышиных фибробластов, медоносных пчел, почек обезьян исследователи наблюдали во всех изучаемых клеточных культурах появление зернистости и множество вакуолей. (Керимбаев А.К., 1972; Гробов О.Ф. с соавт., 1987; Алексеев Ф.М. с соавт., 1991).

Задачей наших исследований было изучение репликации вируса в культурах клеток позвоночных животных.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг., тема (проект) № 0578-2014-0021 "Получить новые знания о чувствительных и резистентных к вирусам и внутриклеточным паразитам клеточным культурам разного видового и тканевого происхождения"

Финансирование работы было получено в рамках Государственного задания из федерального бюджета без привлечения дополнительных источников финансирования.

Все авторы данной публикации подтверждают отсутствие каких-либо конфликтов интересов.

Материалы и методы

В работе использовались культуры клеток, полученные из Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных и криобанка ВИЭВ, такие как клетки почки теленка (ПТ), легкого плода коровы (ЛПК), тестикулов козленка (ТК-ВИЭВ), почки обезьяны (Vero), клетки гибридного штамма свинья* лошадь (A4L). Культуры клеток чувствительны к широкому спектру вирусов, вызывающих заболевания сельскохозяйственных животных (Величко Г.Н., 2014; Гальнбек Т.В. с соавт., 2014; Гальнбек Т.В. с соавт., 2014; Дьяконов Л.П. с соавт., 2003)

Для поддержания клеточных культур применялись питательные среды 0,5% гидролизатлактальбумина, ИГЛА МЕМ, а также комбинации сред ИГЛА МЕМ и 0,5% гидролизатлактальбумина в соотношении 1:1 с 10 % сыворотки крупного рогатого скота или 5 % эмбрионов крупного рогатого скота. Для снятия клеток при пересеве использовали смесь 0,02% раствора версена с 0,25 % раствором трипсина в соотношении 9:1.

Вирусосодержащий материал получали из погибших личинок больной мешотчатым расплодом семьи. Личинок

Информация об авторах / Information about the authors

Калинин А.Г., младший научный сотрудник отдела клеточной биотехнологии и питательных сред, e-mail: kalinin.andrew2010@yandex.ru

Гальнбек Т.В., заведующая отделом клеточной биотехнологии и питательных сред, к.б.н.

Сотников А.Н., заведующий лабораторией болезни пчел, к.б.н.

Володько Д.В., научный сотрудник лаборатории болезни пчел

Потапова И.В., старший лаборант отдела клеточной биотехнологии и питательных сред

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко" г. Москва.

Щукина А.В., врач высшей категории ГБУЗ ДКЦ №1 ДЗМ

Kalinin A.G., Galnbek T.V., Sotnikov A.N., Volodko D.V., Potapova I.V., Schukina A.V.

Рис.1 - Культура клеток ПТ. Контроль. 144 часа. Ок. 10. Об. 40.

Рис.2 - Культура клеток ПТ + BMP. 1 пас. 144 часа. Ок. 10. Об. 100. Эпителиоподобные клетки

Рис.3 - Культура клеток ПТ+ BMP. 1 пас. 144 часа. Ок. 10. Об. 100. Фибробластоподобные клетки

растирали в фарфоровых ступках с физиологическим раствором. Центрифугировали на центрифуге Т-24 при 10 000 оборотов/мин 10 минут. Надсадочную жидкость сливали в пробирки. Центрифугат был профильтрован через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Для приготовления цитологических препаратов суспензию клеток вносили по 1–2 мл. в стерильные пенициллиновые флаконы с покровными стеклами (Menzel-glasser), закрывали и помещали в термостат. При формировании 100% монослоя в культуры клеток вносился вирусный материал. Флаконы с культурой помещали в термостат при $t=34^{\circ}\text{C}$. Через 96–312 часов культуры клеток фиксировали и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимза.

Результаты исследования и обсуждение.

В монослое культуры клеток ПТ вирус через 144 часа, в отличие от контрольных (Рис.1) вызывал образование пустот, нарушение целостности монослоя, разрушение оболочки клеток. В цитоплазме обоих типов клеток – эпителиоподобных и фибробластоподобных – наблюдаются крупные вакуоли. В некоторых клетках вакуоли кольцом окружают ядро. В других очень крупные вакуоли расположены с двух сторон ядра. Встречаются клетки с мелкими вакуолями, также расположенными вокруг ядра (Рис.2-4). Образование крупных вакуолей отмечается и в двухъядерных клетках (Рис.4). Наблюдается пикноз ядер.

В культуре клеток Vero через 168 часов культивирования с вирусом отмечали неразрушенный монослой. В отли-

чие от контроля (Рис.5) в большинстве клеток наблюдается большое количество мелких вакуолей, расположенных во всей цитоплазме. Разрушения монослоя не наблюдается (Рис.6-7).

При культивировании вируса мешотчатого расплода в культуре клеток ТК-ВИЭВ через 312 часов сохраняется целостность монослоя. Ядра в клетках овальной и круглой формы, содержащие 2–7 ядрышек. Как и в культуре ПТ наблюдаются крупные или мелкие вакуоли, расположенные около ядра (Рис. 9-10).

Гибридная культура клеток СПЭВ ТК-* лимфоциты лошади (A4L) представлена двумя типами клеток – эпителиоподобными и лимфоцитоподобными. Эпителиоподобные клетки различных размеров с одним крупным ядром, содержащим 1–2 ядрышка, наблюдаются двухъядерные клетки. Лимфоцитоподобные клетки составляют от 60 до 50% по отношению к общему числу клеток.

В зараженной вирусом мешотчатого расплода культуре клеток A4L через 96 часов культивирования монослой не разрушен, нет окон. Лимфоцитоподобные клетки – округлой формы, расположены в группы или одиночными клетками. Эпителиоподобные – клетки различной формы, часто вытянутой. У эпителиоподобных клеток ядра овальные или округлые, ядрышки различной формы, 1–2 в ядре. Цитоплазма содержит вакуоли разных размеров, заполнивших всю цитоплазму, оболочка клеток разрушена, наблюдается пикноз ядер (Рис.12-13)

Рис.4 - Культура клеток ПТ + BMP. 1 пас. 144 часа. Ок. 10. Об. 100. Образование вакуолей в двухъядерных клетках.

Рис.5 - Культура клеток Vero Контроль., 168 часов. Ок. 10. Об. 40.

Рис.6 - Культура клеток Vero + BMP. 1 пас. 168 часов. Ок. 10. Об. 40. Мелкие вакуоли в цитоплазме.

Рис.7 - Культура клеток Vero + BMP. 1 пас. 168 часов. Ок. 10. Об. 40. Мелкие вакуоли

Рис.8 - Культура клеток ТК-ВИЭВ. Контроль. 312 часов. Ок. 10. Об. 100.

Рис.9 - Культура клеток ТК-ВИЭВ + BMP. 1 пас. 312 часов. Ок. 10. Об. 100. Образование крупных и мелких вакуолей.

Рис.10 - Культура клеток ТК-ВИЭВ + ВМР. 1 пас. 312 часов. Ок. 10. Об. 100. Разрушение клеточной оболочки, образование крупных и мелких вакуолей.

Рис.11 - Гибридная культура клеток А4L Контроль. 96 часов. Ок. 10. Об. 100.

Рис.12 - Гибридная культура клеток А4L + ВМР. 1 пассаж. 96 часов. Ок. 10. Об. 100. Пикноз ядер, образование вакуолей разных размеров.

Рис.13 - Гибридная культура клеток А4L + ВМР. 1 пассаж. 96 часов. Ок. 10. Об. 100. Вакуолизация цитоплазмы.

Рис.14 - Гибридная культура клеток А4L. Контроль. 168 часов. Ок. 10. Об. 100.

Рис.15 - Гибридная культура клеток А4L + ВМР. 1 пассаж. 168 часов. Ок. 10. Об. 100. Разрушение клеточной оболочки, сильная вакуолизация цитоплазмы.

Через 168 часов культивирования вируса в гибридной культуре клеток А4L регистрируется разрушение клеточной оболочки, разрежение монослоя, сильная вакуолизация цитоплазмы. Цитоплазма имеет звездчатую форму. Отмечаются пикнозировавшие ядра, разрушение межклеточных соединений (Рис. 15)

Те же изменения в клетках наблюдаются и в культуре клеток ЛПК через 96 часов. Цитоплазма содержит вакуоли. Наблюдается пикноз ядер. (Рис. 17).

При просмотре культуры клеток ЛПК, зараженной вирусом мешотчатого расплода, через 168 часов видно, что культура состоит в основном из эпителиоподобных клеток. Ядра эпителиоподобных клеток округлой формы, ядрышки округлые или овальные – 3–5 в ядре. Цитоплазма содержит вакуоли. В некоторых клетках вакуоли расположены с двух сторон ядра (Рис. 19-20).

На основании проведенных исследований можно отметить, что для вышеперечисленных клеточных культур вирус индуцирует цитопатогенный эффект в виде образования вакуолей, что согласуется с данными, полученными Гробовым О.Ф. с соавт. (1987 г.).

В результате проведенных исследований было изучены цитопатологические проявления вируса мешотчатого

расплода в культурах клеток разного видового и тканевого происхождения, которые выражались в появлении большого количества вакуолей разных размеров, разрыве оболочки клеток, пикнозе ядер.

Полученные результаты представляют интерес не только в использовании культуры клеток для выделения, накопления и анализа вируса, но и открывают перспективные направления в углубленном его изучении.

Литература

1. Алексеенко Ф.М., Ревенко В.А., Чепурко М.А. Справочник по болезням и вредителям пчел / 2-е изд., перераб. и доп. - К.: Урожай, 1991. - 83с.
2. Батуев Ю.М., Горячева И.И. Идентификация вирусов пчел методами молекулярно-генетического анализа / Пчеловодство. - 2010. - №7. - С. 16-18
3. Батуев Ю.М. Мешотчатый расплод / Пчеловодство. - 2010. - №10. - С. 24-27
4. Величко Г.Н., Шуляк А.Ф., Журавлева Е.А., Гальнбек Т.В., Ломакина Н.Ф. Оценка вирусологических и молекулярных методов в диагностике вирусной диареи - болезни слизистых оболочек КРС. Ж. Ветеринария и кормление, 2014, №5, стр 66-67
5. Гальнбек Т.В., Шуляк А.Ф., Кулешов К.В., Шукина И.В., Штамм диплоидных клеток легкого крупного рогатого скота для репродукции вирусов. Патент 2014, №2515915
6. Гальнбек Т.В., Шуляк А.Ф., Акиншина Г.Т., Потапова И.В., Федоров А.И. Влияние азотнокислого лантана на клетки легкого плода КРС "ЛПК" invitro. Ж. Ветеринария и кормление, 2014, №5, стр 68-69.

Рис.16 - Культура клеток ЛПК. Контроль. 96 часов. Ок. 10. Об. 40.

Рис.17 - Культура клеток ЛПК+ ВМР. 1 пассаж. 96 часов. Ок. 10. Об. 40. Вакуолизация цитоплазмы клеток, пикноз ядер.

Рис.18 - Культура клеток ЛПК. Контроль. 168 часов. Ок. 10. Об. 40.

Рис.19 - Культура клеток ЛПК + ВМР. 1 пассаж. 168 часов. Ок. 10. Об. 40. Вакуолизация клеток, пикноз ядер.

Рис.20 - Культура клеток ЛПК + ВМР. 1 пассаж. 168 часов. Ок. 10. Об. 100. Вакуолизация клеток, пикноз ядер.

7. Гробов О.Ф., Смирнов А.М., Попов Е.Т. Болезни и вредители медоносных пчел: Справочник / - М. Агропромиздат, 1987. - 3, 6 с.
8. Дьяконов Л.П., Майджи Е.В., Гальбек Т.В., Сафина А.Н., Шуляк А.Ф. Культурально-морфологические свойства и чувствительность к вирусам межвидовой гибридной культуры свинья* лошадь (СПЭВ ТК- * лимфоциты лошади) /Ветеринарная патология. - 2003. - №1(5). - С. 68-70
9. Калинин А.Г., Гальбек Т.В. Культивирование вирусов пчел *in vitro* / Труды ВИЭВ, 2016., Том 79, С. 204-211
10. Калинин А.Г., Гальбек Т.В., Куликов Е.В. Подбор культуры для накопления *in vitro* вируса мешотчатого расплода пчел / Вестник РУДН. Серия Агрономия и животноводство. - 2017. - №2. - С.168-174
11. Керимбаев А.К. Изучение некоторых биологических свойств вируса мешотчатого расплода у личинок медоносной пчелы и усовершенствование методов лабораторной диагностики заболевания: дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук - М., 1972. - 70-74 с.
12. Конусова О.Л., Погорелов Ю.Л., Островерхова Н.В., Рассейкина С.А., Нечипуренко А.О., Воротов А.А., Климова Е.А., Прокопьев А.С. Биологическая и хозяйственная оценка семей медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в некоторых районах Томской области / Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2010. - №1(9). - С. 29-30
13. Огурцов А.Ф. Диагностика, профилактика болезней, борьба с вредителями и хищниками пчел- М.: ооо Аквариум Принт, 2005. - 62-63 с.
14. Скребнева Л.А., Билалов Ф.С., Латыпова В.З., Шлычков А.П. Использование медоносных пчел для биоиндикации уровня загрязнения атмосферного воздуха тяжелыми металлами / Вестник технологического университета. - 2015. - Т.18. - №17. - С.248
15. Смирнова Н.И. Использование куриных и пчелиных фибробластов для выделения и культивирования вируса - возбудителя Мешотчатого расплода пчел / Н.И. Смирнова // Новое в разведении и генетике сельскохозяйственных животных, Сборник работ, выпуск XXXV / Ленинград : Министерство сельского хозяйства СССР. Ленинградский ветеринарный институт, 1974. - С. 98-100
16. Сотников А.Н., Королев А.В. Мешотчатый расплод - угроза пчеловодству / Пчеловодство. - 2014. - №5. - С. 30-32.
17. Carrillo-Tripp J, Dolezal A.G., Goblirsch M.J., Miller W.A., Toth A.L., Bonning B.C. In vivo and *in vitro* infection dynamic of honey bee viruses/Sci.Rep. - 2016. - №6. - P. 1-12
18. Castle D. Factors Affecting Global Bee Health. - Belgium: Crop Life International A.I.S.B.L., 2013. - 1-2, 5 p.
19. Coffey M.F., Barth S., Hayes K., Breen J. The health status of Irish honey bee colonies in 2006 / Irish Journal of Agricultural and Food Research. - 2013. - №52. - P. 39-51
20. Oldroyd B.P., Nanork P. Conservation of Asian honey bees / Apidologie. - 2009. - №40. - P. 296-312
21. Singh, D.A. Focus on honey bees in the tropics / Current science. - 2000. - Vol. 79. - №9,10. -P. 1155