

УДК 639 3 091 619 578

На правах рукописи



Щелкунова Татьяна Ивановна

**ПЕРЕВИВАЕМЫЕ ЛИНИИ КЛЕТОК КАРПА (*Cyprinus carpio*)
И СИБИРСКОГО ОСЕТРА (*Acipenser baeri*),
ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИХТИОВИРУСОЛОГИИ**

03 00 06 - вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Покров - 2008 г

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ) РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ и Федеральном государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства» (ФГУП «ВНИИПРХ») Федерального агентства по рыболовству Минсельхоза России

Научный руководитель

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Балышева Вера Ивановна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук,
профессор

Юрков Сергей Григорьевич

кандидат биологических наук

Пыльнов Владимир Александрович

Ведущая организация ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им ЯР Коваленко» РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ (ГНУ «ВИЭВ»)

Защита состоится 22 февраля 2008 г в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006 003 01 при Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ) РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ по адресу 601120, г Покров Владимирской области, ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ Тел /факс (49243) 62125

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке института

Автореферат разослан "18 " января 2008 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



В Я Савукова

1 Общая характеристика работы

Актуальность темы

Метод культуры клеток – основополагающий метод, появление которого в свое время привело к бурному развитию вирусологии, - и сегодня остается одним из главных ее инструментов. Потенциально бессмертные перевиваемые клеточные линии являются незаменимой экспериментальной моделью и нашли чрезвычайно широкое применение при проведении вирусологических исследований болезней рыб и в биотехнологии при производстве противовирусных вакцин.

В 1957 г. в США на первичной культуре клеток из плавников радужной форели от рыб был выделен первый вирус – возбудитель инфекционного некроза поджелудочной железы [Wolf, 1960], а вскоре там же была получена первая перевиваемая клеточная линия рыб из гонад радужной форели - RTG-2 [Wolf, Qumby, 1962]. Несколько лет спустя были получены новые перевиваемые клеточные линии рыб GF-1 - из плавников синеполосой ронки [Clem et al., 1961], FHM - из хвостового стебля черного толстоголова [Gravell, Malsberger, 1965], STE-137 - из эмбриона радужной форели [Fryer et al., 1965], BF-2 - из хвостового стебля синежаберного солнечника [Wolf, Qumby, 1966] и другие.

С тех пор общее количество клеточных линий рыб стало нарастать лавинообразно, и сегодня их насчитывается более 430. Этот процесс отражает общее развитие ихтиовирусологии. Благодаря большому разнообразию появившихся клеточных линий рыб и их применению в вирусологической работе, обнаружено около половины из открытых на сегодня почти 400 ихтиовирусов. Новые клеточные линии позволяют обнаруживать и новые вирусы. Так, после получения трех клеточных линий карпа - CCB, CCG и CaF₂ [Neukirch, 1999] - от больных рыб удалось выделить сразу пять разных вирусов [Neukirch, Kunz, 2001].

Помимо вирусологических исследований, клеточные линии рыб сегодня активно используются в иммунологии [Miller et al., 1994], генетике [Gold, 1979, Isa, Shima, 1987], токсикологии и бактериологии [Ahne, 1985], для выделения от рыб риккетсий [Lanna, Fryer, 1991], микоплазм, внутриклеточных протозоа [Kolbl, 1989], культивирования простейших эктопаразитов рыб [Pugovkin, Wahli, 2001].

В нашей стране метод культуры клеток рыб впервые применили 45 лет назад в ГосНИОРХе [Тец, Яковлева, 1962]. Позднее исследования по получению культур клеток рыб были развернуты в УкрНИИРХе [Осадчая, 1964], ВИЭВе [Рудиков, 1964], БелНИИРХе [Мамыш, 1975], БелНИВИ [Головнев, Екельчик, 1978] и других.

институтах страны Несмотря на серьезные усилия, получить перевиваемые культуры клеток не удавалось

За последнюю четверть века большой скачок в своем развитии претерпела мировая аквакультура – целенаправленное культивирование рыб и других гидробионтов для потребления человеком или восстановления их природных запасов Однако развитие аквакультуры осложняется распространением имеющихся и появлением новых вирусных болезней рыб [OIE, 2003] Для их своевременного выявления ихтиовирусологам необходимо иметь в своем арсенале набор клеточных линий, чувствительных к широкому спектру вирусов Этого требует и значительно обострившаяся в последние годы в стране эпизоотическая ситуация по особо опасным вирусным болезням культивируемых рыб [Щелкунов, 2006]

Так, начиная с 2000 г, на рыбоводных предприятиях страны были зарегистрированы две экзотические вирусные инфекции – инфекционный некроз гемопозитической ткани лососевых рыб и инфекционный некроз поджелудочной железы В 2003-2006 гг, после многолетнего перерыва, были выявлены новые случаи весенней виремии карпа, а в 2006 г в стране была диагностирована первая вирусная болезнь у культивируемых осетровых рыб Серьезную угрозу рыбоводству представляют и граничащие с Россией скандинавские страны, государства континентальной Европы и юго-восточной Азии, где зарегистрированы опасные болезни, не установленные в нашей стране Ускоренное развитие аквакультуры и активизация международной торговли живыми объектами разведения несут угрозу дальнейшего распространения заразных болезней рыб Поэтому для ихтиовирусологии исследования по получению перевиваемых клеточных линий рыб, являющихся ключевым инструментом при разработке методов диагностики и профилактики вирусных заболеваний, по-прежнему высоко актуальны

Цель и задачи исследований

Целью данной работы является получение перевиваемых клеточных линий карпа (*Cyprinus carpio*) и сибирского осетра (*Acipenser baeri*) и оценка возможности их использования для вирусологических исследований рыб

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи

- эксплантировать и длительно поддерживать в первичной культуре клетки овариальной ткани карпа, паренхиматозных органов и плавников сибирского осетра для использования их в качестве исходного материала при получении перевиваемых линий клеток,

- получить перевиваемую линию клеток яичников неполовозрелого карпа,
- получить перевиваемые линии клеток пула паренхиматозных органов и плавников сибирского осетра,
- определить чувствительность полученных клеточных линий к широко распространенным вирусам рыб разных таксономических групп,
- провести паспортизацию полученных клеточных линий и депонировать их в Российской коллекции клеточных культур

Научная новизна результатов

Впервые получена отечественная перевиваемая линия клеток яичников неполовозрелого карпа (ICO)

Впервые получены две перевиваемые линии клеток пула паренхиматозных органов (SSO-1 и SSO-2) и две перевиваемые линии клеток плавников сибирского осетра (SSF-1 и SSF-2)

Изучены морфологические, кариологические, культуральные и другие свойства полученных перевиваемых клеточных линий рыб

Определена чувствительность клеточных линий к широко распространенным вирусам рыб разных таксономических групп (семейств карповых, лососевых, ссетровых, угревых и щуковых)

Практическая значимость результатов

1 Перевиваемая линия клеток ICO яичников неполовозрелого карпа рекомендована для выделения, идентификации и изучения вирусов рыб разных таксономических групп и включена в Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб, утвержденные Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России

2 Полученные перевиваемые линии клеток тканей сибирского осетра (SSO-1, SSO-2, SSF-1 и SSF-2) рекомендованы для выделения, идентификации и изучения свойств вирусов разных таксономических групп рыб Их использование позволило диагностировать первую вирусную болезнь у осетровых рыб в России – герпесвирусную болезнь сибирского осетра

3 Паспортизированы и депонированы в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции клеточных культур при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии (СХЖ РАСХН) две

перевиваемые линии клеток штамм постоянной линии клеток яичников неполовозрелого карпа (ICO) и штамм постоянной линии клеток пула паренхиматозных органов сибирского осетра (SSO-2) Поданы заявки на их патентование (на ICO № 2007132282, на SSO-2 № 2007132283 от 28 08 2007)

Основные положения, выносимые на защиту

- монослойная перевиваемая линия клеток ICO яичников неполовозрелого карпа с эпителиоподобной морфологией, имеет кариотип, близкий к кариотипу хозяина и чувствительна к шести вирусам рыб четырех разных семейств,

- монослойная перевиваемая линия клеток SSO-2 пула паренхиматозных органов сибирского осетра с фибробластоподобной морфологией, имеет кариотип с гипотриплоидным набором хромосом клеток модального класса и чувствительна к восьми вирусам рыб пяти разных семейств,

- монослойная перевиваемая линия клеток SSO-1 пула паренхиматозных органов сибирского осетра с эпителиоподобной морфологией, чувствительна к восьми вирусам рыб пяти разных семейств,

- монослойные перевиваемые линии клеток SSF-1 и SSF-2 плавников сибирского осетра со смешанной и фибробластоподобной морфологией, соответственно, чувствительны к семи вирусам рыб пяти разных семейств,

- методология получения монослойных перевиваемых линий клеток рыб включает щадящую дезагрегацию донорской ткани, одновременное использование питательных сред разного состава, высев донорских клеток в виде "миникультур" и длительное поддержание последних, отбор клеточных популяций для субкультивирования и дифференцированную дезагрегацию клеточного монослоя

Апробация результатов работы

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого Совета ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ в 2003-2007 гг, Первом конгрессе ихтиологов России (сентябрь 1997 г, г Астрахань), Международном симпозиуме «Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата» (апрель 2007 г, г Астрахань)

Материалы диссертации представлены на Седьмой международной конференции Европейской ассоциации ихтиопатологов (сентябрь 1995 г, Пальма-де-Майорка, Испания), Второй двусторонней российско-американской конференции «Здоровье водных и морских животных» (сентябрь 2003 г, г Шеффердстаун, США), Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (октябрь 2006 г, г Санкт-Петербург)

Опубликованность результатов

Основные результаты диссертации опубликованы в 12 научных работах, в том числе 5 статей в журналах по перечню ВАК, глава в книге, глава в учебном пособии для студентов высших учебных заведений, 1 статья в сборнике научных трудов, 4 - в материалах научных конференций (2 из них - в зарубежных)

Личный вклад соискателя

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно

Исследования проведены в лаборатории ихтиопатологии ФГУП "ВНИИПРХ" и в лабораториях "Биофизика" и "Здоровье гидробионтов" ГНУ ВНИИВВиМ ПЦР-тестирование линий клеток на наличие микоплазм проводили в лаборатории "Бактериология" ГНУ ВНИИВВиМ (к.в.н. И.Ю. Егорова). Исследования по подтверждению видовой идентичности полученных клеточных линий проводили в Центре молекулярно-генетической идентификации (руководитель к.б.н. В.А. Барминцев) Научного органа СИТЕС в Российской Федерации в отношении осетровых видов рыб. Кариологический анализ перевиваемой культуры клеток ICO проводили совместно со ст.н.с. лаборатории генетики ВНИИПРХ О.А. Емельяновой. Автор выражает искреннюю признательность всем исполнителям и участникам этих работ.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 154 страницах, иллюстрирована 15 таблицами и 31 рисунком и дополнена 8 приложениями. Список используемой литературы включает 318 источников, из которых 44 - отечественные.

2 Собственные исследования

2.1 Материалы и методы

Рыба карп, сибирский осетр, радужная форель, белый амур, гибрид белого и пестрого толстолобиков, выращенные на экспериментальной базе Центрального экспериментального отдела "Якоть" ФГУП "ВНИИПРХ".

Перевиваемые линии клеток рыб эмбриона атлантического лосося (ASE) [Walker, Hill, 1980], хвостового стебля синежаберного солнечника (BF-2) [Wolf, Quimby, 1966], сердца кеты (СНН-1) [Lannan, 1984], эпидермальных новообразований больного оспой карпа (ЕРС) [Fijan et al., 1983], хвостового стебля черного толстолоба (FHM) [Gravell, Malsberger, 1965], кожи белого осетра (WSSK-1) [Hedrick et al., 1991].

- Вирусы - вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHNV), шт FU/0204 (инфекционная активность – 7,5 lg ТЦД₅₀/см³),
- вирус весенней виремии карпа (SVCV), шт M2 (8,0 lg ТЦД₅₀/см³),
 - вирус вирусной геморрагической септицемии (VHSV), шт ЧФ 12 (9,0 lg ТЦД₅₀/см³),
 - вирус европейского угря (EVEX), шт УФ (7,5 lg ТЦД₅₀/см³),
 - рабдовирус мальков щуки (PFRV) (8,3 lg ТЦД₅₀/см³),
 - вирус европейской озерной кумжи (ELTV) (7,0 lg ТЦД₅₀/см³),
 - везикуловирус IV геногруппы, изолят "Necht" (8,3 lg ТЦД₅₀/см³),
 - бирнавирус инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV) (8,0 lg ТЦД₅₀/см³),
 - иридовирус карпа (CCIV), шт 4БЖ (6,0 lg ТЦД₅₀/см³),
 - герпесвирус сибирского осетра (SSHV), шт SK1/0406 (5,6 lg ТЦД₅₀/см³)

Вирусы поддерживали в лабораторной коллекции ФГУП "ВНИИПРХ" и лаборатории "Здоровье гидробионтов" ГНУ ВНИИВВиМ

Питательные среды среда Игла основная, Игла MEM, Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (2MEM), 199, RPM1 1640, Лейбовица L15, триптозофосфатный бульон (ТФБ)

Сыворотки сыворотка крови плода коровы (СПК)

При культивировании перевиваемых клеточных линий рыб использовали рекомендации, описанные авторами для каждой линии

Первичные культуры клеток получали путем ферментативной дезагрегации тканей рыб-доноров Рыбу обездвиживали добавлением в воду анестетика MS 222 и вскрывали с использованием правил асептики и антисептики

Цитоморфологические методы Для изучения морфологических особенностей клеточных линий проводили регулярное, в течение всего срока инкубации, микроскопирование нативных и окрашенных по Паппенгейму препаратов [Мусселиус и др , 1983]

Кариологические методы Для кариологического анализа препараты хромосом готовили стандартным методом [Голубев и др , 1976] с последующей окраской 1%-ным красителем Гимза на фосфатном буфере (рН 6,8) Подсчет числа хромосом вели в 100 метафазных пластинках каждой линии, используя компьютерную программу ACD Photo Editor 3 1

Вирусологические методы Накопление вирусов в культурах клеток, экспериментальное воспроизведение заболеваний, отбор и обработку

патологического материала, выделение вирусов из патологического материала, титрование вирусов в культурах клеток проводили согласно принятым методам [Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб, 1998] Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча

Чувствительность полученных клеточных линий определяли к 10 широко распространенным вирусам рыб, перечисленным выше

Чувствительность выявления вируса определяли параллельным титрованием на всех полученных клеточных линиях 10% суспензии патологического материала от экспериментально зараженных вирусами (IHNV, VHSV, SVCV, IPNV, SSHV) рыб или культурального вируса (EVEX, PFRV, ELTV, "Hecht", CCIV), накопленного на референсной клеточной линии

Вирусрепродуцирующую активность культуры клеток определяли титрованием на ней культурального вируса, прошедшего на этой культуре клеток не менее трех пассажей

Микробиологические методы Стерильность клеточных линий определяли путем высева на питательные среды МПБ, МПА, Китта-Тароцци, тиогликолевую, С.абура

ПЦР-метод Тестирование клеточных линий проводили согласно Наставлению по применению тест-системы «МИК-КОМ» для диагностики микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции (1998)

Видовую идентичность подтверждали с помощью молекулярно-генетического анализа участка D-петли митохондриальной ДНК с использованием ПЦР-метода с еидоспецифическими для осетровых рыб праймерами (для клеточных линий из тканей сибирского осетра) и митохондриального гена цитохром-оксидазы I с использованием секвенирования полученных ампликонов и определения идентичности исследованных последовательностей эталонным образцам из GenBank (для клеточной линии яичников неполовозрелого карпа)

Статистическая обработка результатов Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами [Лакин, 1990]

2 2 Результаты исследований

2 2 1 *Получение перевиваемой клеточной линии яичников неполовозрелого карпа, *Suipinus carpio**

В качестве доноров ткани использовали четырехгодовалых самок карпа, имеющих вторую стадию зрелости гонад по шкале Киселевича Яичники измельчали

на кусочки объемом 2-3 мм³ и промывали несколько раз средой Игла MEM. Дезагрегирование ткани проводили при комнатной температуре щадящим методом дробной дезагрегации, чередуя 10-15-минутные обработки 0,5%-ным раствором трипсина с такими же обработками средой Игла MEM.

После центрифугирования (60g, 15-20 мин) осадок клеток ресуспендировали в среде Игла MEM с 10% СПК и высевали в пробирки по 6×10^5 – 1×10^6 клеток. В качестве ростовой среды использовали среды разного состава с 10-20% СПК и антибиотиками. Клетки инкубировали при различных температурах (21°, 24°, 28°, 33°C).

Через двое суток после посева в пробирках, инкубировавшихся при 28°C в среде Игла MEM с 20% СПК, образовывался монослой, состоявший преимущественно из фибробластоподобных клеток. На других питательных средах и при других температурах рост был заметно хуже. Для субкультивирования использовали первичные культуры клеток разного возраста. Через сутки образовывался монослой, состоявший из фибробластоподобных клеток. Однако дальнейшее субкультивирование не приводило к формированию монослоя, прикрепившиеся клетки постепенно округлялись и отделялись от поверхности субстрата.

В отдельных пробирках на 9 сутки появились островки эпителиоподобных клеток. После внесения диспергирующего раствора все клетки, кроме последних, легко снимались с поверхности. Добавление в эти пробирки среды Игла MEM с 10% СПК и 2% триптозофосфатного бульона способствовало росту эпителиоподобных клеток и образованию сплошного монослоя. На 12 сутки было начато субкультивирование этих культур. Дальнейшее пассирование клеток было успешным и привело к получению клеточной линии, получившей название ICO (immature carp ovaries).

2.2.2. Получение перевиваемых клеточных линий пула паренхиматозных органов сибирского осетра, *Acipenser baeri*

В качестве доноров использовали двух сеголетков осетра. В асептических условиях извлекали печень, почку и селезенку, измельчали и многократно отмывали средой Игла MEM до получения прозрачной надосадочной жидкости. Дезагрегация и последующая обработка ткани была аналогична таковой при получении первичной культуры из гонад карпа. Клетки ресуспендировали в среде 199 с 20% СПК и антибиотиками до конечной концентрации 1×10^6 кл./см³, разливали в пробирки по

1 см³ и инкубировали при 21,5°C. Через двое суток образовывался монослой, состоявший из смеси фибробласто- и эпителиоподобных клеток.

Субкультивирование первичных культур проводили спустя разные интервалы времени с момента посева (18-33 сут). При первом субкультивировании легко удавалось отделять эпителиоподобные клетки, тогда как фибробластоподобные оставались прикрепленными к субстрату. Посев эпителиоподобных клеток приводил к формированию монослоя, состоявшего из клеток той же морфологии. Однако удалось провести только три пассажа этих клеток. При дальнейших пересевах монослой не образовывался, и рост клеток прекратился.

В пробирки с оставшимися фибробластоподобными клетками добавляли свежую порцию питательной среды (199 с 20 % СПК и антибиотиками) и продолжали инкубировать при той же температуре, что и первичные культуры. Через трое суток формировался полный монослой. При дальнейших пересевах в части пробирок монослой формировался на 4-6 сутки и был представлен крупными фибробластоподобными клетками, тогда как в других пробирках росли мелкие фибробластоподобные клетки, которые значительно быстрее формировали монослой (через сутки).

Крупные фибробластоподобные клетки дали начало клеточной линии SSO-2 (Siberian sturgeon organs – 2), которая успешно культивируется на протяжении уже более 190 пассажей без заметного изменения морфологии клеток. До 45 пассажа мелкие фибробластоподобные клетки культивировали в среде 199, а затем перевели на среду Игла 2MEM с 20% СПК. Со временем культивирование в среде Игла 2MEM привело к изменению морфологии клеток, и на протяжении уже более 100 пассажей монослой этой культуры представлен эпителиоподобными клетками полигональной формы. Эта клеточная линия получила название SSO-1 (Siberian sturgeon organs – 1) и прошла уже более 220 пассажей.

2.2.3. Получение перевиваемых клеточных линий плавников сибирского осетра, *Acipenser baeri*

Кусочки хвостовых плавников восьми сеголетков осетра помещали в среду Игла MEM с антибиотиками (1000 ЕД/см³ пенициллина, 1000 мкг/см³ стрептомицина, 200 ЕД/см³ нистатина) в соотношении 1:10, выдерживали 10 мин при регулярном помешивании, затем среду сливали, добавляли свежую порцию того же состава, и так повторяли трижды. После этого плавники обрабатывали в 70° этиловом спирте

(5-7 сек), после чего трехкратно отмывали в среде Игла MEM, содержащей 300 ЕД/см³ пенициллина, 300 мкг/см³ стрептомицина, 100 ЕД/см³ нистатина

Обработанные плавники измельчали ножницами до величины 1-2 мм, трижды отмывали средой того же состава. К полученной ткани добавляли 0,25%-ый раствор трипсина в соотношении 1:10. После 15-минутной дезагрегации на магнитной мешалке при комнатной температуре надосадочную жидкость отбрасывали, трижды промывали ткань средой Игла MEM, добавляли, свежую порцию раствора трипсина и дальнейшую дезагрегацию проводили на магнитной мешалке в течение ночи при температуре 6°C, а затем еще 1 час при комнатной температуре (21°C). Последующие манипуляции были аналогичны таковым при получении первичной культуры из пула паренхиматозных органов. В качестве ростовых сред использовали среду 199 с 20% СПК и среду Игла MEM с 20% СПК.

Через двое суток после посева на обеих средах образовывался монослой, состоявший из смеси фибробласто- и эпителиоподобных клеток. За первичными культурами вели длительное наблюдение, в некоторых пробирках периодически производили смену среды (по мере ее закисления). Со временем в отдельных пробирках происходило изменение морфологии: в одних – стали преобладать эпителиоподобные клетки, в других появлялись островки фибробластоподобных клеток.

Субкультивирование первичных культур проводили в разные сроки с момента посева (от 22 дней до 5 месяцев) по методу, описанному для культур паренхиматозных органов. В качестве ростовой среды использовали среды того же состава, что и при получении первичных культур. Субкультуры удавалось получить и пассировать до 2-8 раз, после чего клетки погибали.

В одной из пробирок с первичной культурой клеток после четырех месяцев инкубации произошло почти полное вытеснение фибробластоподобных клеток эпителиоподобными. Субкультивирование этой культуры в среде 199 с 20% СПК ("Gibco") на протяжении 24 пассажей приводило к образованию монослоя из неоднородных, но преимущественно эпителиоподобных клеток. С 25 пассажа культуру перевели на среду Игла 2MEM с 20% СПК. Многократное субкультивирование дало начало перевиваемой клеточной линии SSF-1 (Siberian sturgeon fins -1). К настоящему времени клеточная линия прошла более 220 пассажей.

Из пробирок с первичными культурами, в которых в процессе длительной инкубации (около 4 месяцев) появились островки фибробластоподобных клеток,

диспергирующим раствором удалось снять все клетки, кроме клеток, образующих островки. Добавление среды 199 с 20% СПК и инкубация при 21,5°C привели к формированию монослоя, состоявшего только из фибробластоподобных клеток. Дальнейшие пересевы клеток оказались успешными, в результате чего была получена клеточная линия SSF-2 (Siberian sturgeon fins -2), к настоящему времени она прошла более 220 пассажей без изменения морфологии клеток.

Содержание сыворотки в ростовой среде для всех полученных клеточных линий было постепенно снижено до 10%, а добавление антибиотиков прекращено.

2.2.4 Характеристика перевиваемых клеточных линий

Морфология линии клеток ICO После посева клетки группируются по 5-10 клеток, а спустя 3-4 часа расплываются по поверхности субстрата, образуя островки, являющиеся очагами роста. Островки затем сливаются с образованием монослоя. Монослой ровный. Клетки эпителиоподобные, преимущественно однородные, их форма близка к кубической. Ядра крупные округлые, число ядрышек от 1 до 3, чаще 1. Ядрышки крупные, при окраске по Паппенгейму окружены зоной просветления. Цитоплазма гомогенная.

Кариологическая характеристика линии клеток ICO Кариологическими исследованиями (59 и 690 пассаж) установили, что модальный класс клеточной линии ICO 59 пассажа представлен клетками, содержащими 100 хромосом, при интервале варьирования - от 95 до 104 (рис 1). Величина модального класса равнялась 56%. Хромосомный набор донорского вида - $2n = 100$ [Васильев, 1985]. На 690 пассаже модальный класс уменьшился до 90 хромосом, а его величина снизилась до 36%. При этом интервал варьирования хромосом резко возрос - от 71 до 178 (рис 2).

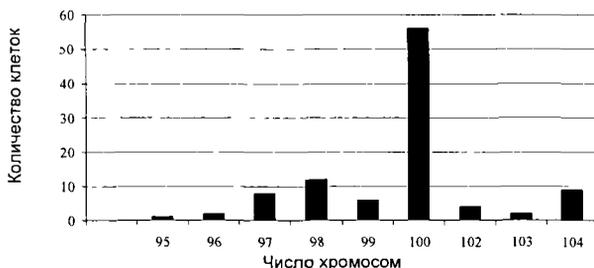


Рис 1 Гистограмма распределения числа хромосом в клетках линии ICO 59 пассажа

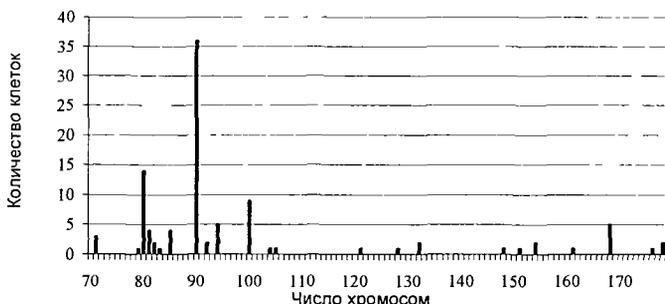


Рис 2 Гистограмма распределения хромосом в клетках линии ICO 690 пассажа

Морфология линии клеток SSO-1 При посеве клетки линии SSO-1 равномерно распределяются по поверхности субстрата. Клетки эпителиоподобные, преимущественно однородные, полигональной формы. Ядра клеток крупные, округлой, овальной, бобовидной или подковообразной формы, нередко с фестончатыми краями. Число ядрышек от 2 до 7, чаще 3-4. При окраске по Паппенгейму структура ядер гомогенная, цитоплазмы - мелкозернистая. В клеточном монослое нередки многоядерные клетки - симпласты, обычно имеющие по 4-5 округлых ядер, расположенных в виде кольца.

Морфология линии клеток SSO-2 При посеве клетки равномерно распределяются по поверхности субстрата. Монослой состоит из пучков крупных фибробластоподобных клеток типичной веретенообразной формы. Ядра крупные, овальной формы. Число ядрышек от 2 до 6, чаще 3-4. Структура ядра и цитоплазмы гомогенная.

Кариологическая характеристика линии клеток SSO-2 В силу того, что клетки линии SSO-2 содержат большое количество микрохромосом (более половины от общего числа), подсчитать их количество с точностью до одной хромосомы было невозможно. Число хромосом в клетках колебалось от 186 до 371. Предварительный анализ распределения хромосом показал, что оно не имеет выраженных максимумов, и наибольшее количество клеток, содержащее одинаковое число хромосом, не превышало 8. Поэтому для построения гистограммы распределения хромосом был применен метод вариационных рядов [Лакин, 1990] с расчетом моды и классовых вариантов. После обработки данных было установлено, что 44% клеток содержат число хромосом в пределах одного класса (от 355 до 374). Этот класс и

был принят за модальный, классовой вариант и мода которого равнялись 364 (рис 3) Хромосомный набор донорского вида – $2n=248\pm 5$ [Васильев, 1985]

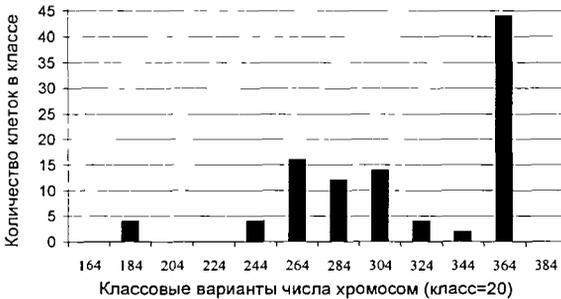


Рис 3 Гистограмма распределения числа хромосом в клетках линии SSO-2 186 и 190 пассажиров

Морфология линии клеток SSF-1 Популяция клеток линии SSF-1 представлена как эпителио- так и фибробластоподобными клетками В первые 7 суток после посева преобладают в основном эпителиоподобные клетки При окраске по Паппенгейму клетки отросчатые, распластанные по субстрату, с размытыми краями Контакты между клетками неплотные, с большим межклеточным пространством Ядра средних размеров, овальной формы, с четко очерченными границами Цитоплазма и кариоплазма гомогенны Количество ядрышек от 1 до 7, чаще 2-3 на клетку С увеличением возраста культуры морфология клеток постепенно меняется на фибробластоподобную Образующиеся фибробласты представляют собой тонкие длинные нитеподобные клетки

Морфология линии клеток SSF-2 Монослой линии SSF-2 состоит из рыхло лежащих фибробластоподобных клеток, расположенных пучками При окраске по Паппенгейму цитоплазма клеток выглядит неоднородной, с интенсивно и слабоокрашенными участками Ядра клеток крупные, кариоплазма гомогенная Количество ядрышек от 1 до 6, чаще 3-4 на клетку

Влияние посевной плотности клеток на рост клеточных линий Величина посевной плотности (количество клеток, приходящееся на 1 см² рабочей поверхности) влияла как на время формирования монослоя, так и на индекс пролиферации клеток

Высокая посевная плотность ($\geq 505 \times 10^3$ кл /см² для ICO и $\geq 62 \times 10^3$ кл /см² для SSO-2) приводила к формированию очень плотного монослоя уже через 4 часа

после посева Спустя 3-5 суток отмечали начало дегенерации культуры. Формирование монослоя замедлялось или вообще не происходило при посеве клеток с низкой плотностью ($\leq 95 \times 10^3$ кл /см² для ICO и $\leq 16 \times 10^3$ кл /см² для SSO-2). Прирост клеток за время наблюдения был незначительным как при чрезмерно высокой, так и при низкой плотности посева.

В результате проведенных исследований определена оптимальная посевная плотность клеток для каждой клеточной линии: ICO - 3×10^5 кл /см², SSO-1 – $(9-12) \times 10^4$ кл /см², SSO-2 – 3×10^4 кл /см², SSF-1 – $(8-10) \times 10^4$ кл /см², SSF-2 – $(13-15) \times 10^4$ кл /см².

Влияние состава среды на рост клеток. Результаты испытаний показали, что клетки линии ICO могут расти во всех использованных средах, но среда Игла 2MEM обеспечивала наилучший стартовый рост клеток после посева, достаточно высокий индекс пролиферации (табл. 1) и хорошую сохранность клеточного монослоя до конца срока наблюдения. Несмотря на более высокий "урожай" клеток к концу эксперимента, в средах Игла основная, L15 и RPMI 1640 через 10 суток отмечали заметную дегенерацию монослоя.

Рост клеток линии SSO-1 отмечался во всех испытанных средах и имел схожую динамику. Но наибольший прирост клеток наблюдали при культивировании в средах Игла MEM и Игла 2MEM.

Таблица 1

Влияние состава среды культивирования на ростовые показатели полученных клеточных линий (n=3)

Линия клеток	Индекс пролиферации*) время формирования монослоя (сут) в разных питательных средах					
	Игла основная	Игла MEM	Игла 2MEM	199	RPMI 1640	L15
ICO	5,5±0,1/ 6	4,6±0,1/ 4	4,9±0,2/ 1	5,1±0,1/ 6	5,2±0,1/ 6	5,9±0,2/ 2
SSO-1	3,9±0,2/ 1	4,7±0,2/ 1	5,0±0,1/ 1	3,2±0,2/ 1	3,5±0,1/ 1	3,5±0,1/ 1
SSO-2	2,9±0,1/ 4	2,4±0,1/ 2	2,2±0,2/ 2	4,1±0,1/ 1	3,1±0,1/ 2	3,1±0,1/ 2
SSF-1	3,5±0,2/ 1	4,4±0,1/ 1	4,6±0,1/ 1	2,9±0,1/ 1	4,7±0,2/ 1	2,4±0,1/ 1
SSF-2	2,2±0,1/ 1	2,2±0,2/ 1	2,1±0,2/ 1	4,0±0,1/ 1	2,2±0,1/ 1	2,3±0,1/ 1

Примечание * - средняя арифметическая ± среднее квадратическое отклонение

Во всех испытанных средах, кроме основной среды Игла и L15, через сутки после посева клеток линии SSO-2 отмечали прирост клеток. Культивирование в средах Игла и 199 не приводило к появлению признаков дегенерации монослоя на протяжении всего срока наблюдения, тогда как в средах RPMI 1640 и L15 на 5 сутки отмечали появление округлых клеток на поверхности монослоя, количество которых возрастало с увеличением срока инкубации. Наибольший урожай клеток (индекс

пролиферации 4,1) наблюдали в среде 199, которая рекомендована нами для культивирования этой линии клеток

Пролиферацию клеток линий SSF-1 и SSF-2 отмечали во всех испытанных средах. Монослой формировался уже через сутки, однако динамика роста этих клеточных линий на разных средах была различной. Наилучший рост клеток линии SSF-1 наблюдался в средах Игла MEM, Игла 2MEM и RPMI 1640 (индекс пролиферации соответственно 4,4, 4,6 и 4,7), в то время как клетки SSF-2 лучше росли в среде 199 (индекс пролиферации 4) и значительно хуже в других питательных средах (табл. 1). К тому же в процессе культивирования клеток линии SSF-2 в средах Игла MEM, Игла 2MEM, RPMI 1640 и L15 происходило изменение их морфологии. Из фибробластоподобных клетки становились эпителиоподобными.

Влияние содержания сыворотки в ростовой среде на рост клеток

Суспензии клеток линий ICO и SSO-2 с оптимальной посевной плотностью готовили в ростовых средах с разным содержанием сыворотки крови плода коровы (от 2 до 20%), высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при оптимальных для каждой из них температурах.

Пролиферация клеток ICO и SSO-2 происходила во всех вариантах питательных сред, однако концентрация сыворотки влияла на динамику роста клеток, скорость образования монослоя, индекс пролиферации (табл. 2) и длительность сохранения культур. При культивировании клеток ICO в среде с 2-15% СПК скорость роста клеток возрастала с увеличением содержания сыворотки, и плотность клеток достигала максимальных значений к 14-ым суткам (17-ым суткам для 2% СПК). Дальнейшее увеличение содержания сыворотки было избыточным и приводило к снижению темпов роста клеток и более ранней дегенерации культуры. Результаты опыта показали, что оптимальной концентрацией сыворотки для клеток линии ICO является 10%.

Таблица 2

Влияние концентрации сыворотки в ростовой среде на ростовые показатели клеток линий ICO и SSO-2 (n=3)

Линия клеток	Индекс пролиферации/ время формирования монослоя (сут) в средах с разными концентрациями сыворотки				
	2%	5%	10%	15%	20%
ICO	2,7±0,2/ 3	4,1±0,2/ 2	5,0±0,1/ 1	5,1±0,2/ 1	4,0±0,1/ 1
SSO-2	2,0±0,2/ 11	3,2±0,1/ 7	4,0±0,2/ 1	4,3±0,2/ 1	3,8±0,1/ 2

Через сутки после посева клеток линии SSO-2 монослой был полностью сформирован в среде с 10-15% СПК, тогда как с 2-5% СПК он формировался значительно медленнее (с 5% через 7 суток, с 2% - 11суток) В среде с 20% СПК через сутки плотность клеток оставалась в пределах посевной, а монослой был сформирован примерно на 90% На 14 сутки культивирования в среде этого состава отмечали появление признаков дегенерации культуры Таким образом, оптимальной концентрацией сыворотки для клеток линии SSO-2 является 10-15%

Влияние температуры инкубации на рост клеток Пролиферация клеток линии ICO наблюдалась в интервале температур от 15° до 30°C с оптимумом 25°C, линий SSO-1 и SSF-2 - от 15° до 25°C с оптимумом 20°C, линии SSO-2 - от 10° до 30°C с оптимумом 20-25°C, линии SSF-1 - от 10° до 30°C с оптимумом 20°C (табл 3) Оптимальные температуры роста клеточных культур были близки к таковым рыб-доноров (каarp – 22-28°C, осетр – 20-26°C) [Щербина, Гамыгин, 2006]

Таблица 3
Влияние температуры инкубации на индекс пролиферации полученных клеточных линий (n=3)

Линии клеток	Индекс пролиферации при различных температурах (°C) инкубации					
	10	15	20	25	30	35
ICO	0,9±0,2	3,1±0,1	4,3±0,1	5,2±0,1	3,4±0,2	0,9±0,2
SSO-1	1,1±0,1	2,2±0,2	3,6±0,2	3,3±0,1	1,1±0,2	н и
SSO-2	2,2±0,2	3,0±0,2	2,8±0,1	3,2±0,1	2,0±0,1	н и
SSF-1	2,2±0,2	4,5±0,1	4,6±0,1	4,1±0,1	2,4±0,2	н и
SSF-2	1,0±0,1	2,5±0,1	4,4±0,2	3,4±0,2	0,9±0,1	н и

Примечание н и - не исследовали

Чувствительность к вирусам рыб Установлено, что клеточная линия ICO высокочувствительна почти ко всем испытанным рабдовирусам рыб за исключением ELTV (табл 4, 5) Она также чувствительна к иридовирусу CCIV и не чувствительна к бирнавирусу IPNV и герпесвирусу SSHV

Клеточная линия SSO-2 чувствительна к герпесвирусу SSHV и ко всем испытанным рабдовирусам рыб различных семейств, но нечувствительна к IPNV и CCIV Клеточная линия SSO-1 была чувствительна к тому же спектру вирусов, что и линия SSO-2 Однако такие вирусы, как SVCV, IHNV, PFRV и изолят "Necht", накапливались в ней в более низких титрах, тогда как титр вируса VHS в ней был на 2,5 порядка выше, чем в SSO-2

Спектры чувствительности клеточных линий SSF-1 и SSF-2 к вирусам рыб схожи, но в то же время индивидуальны. Обе клеточные линии чувствительны к герпесвирусу SSHV и почти ко всем испытанным рабдовирусам рыб, за исключением вируса IHN (табл. 4, 5). Они нечувствительны также к IPNV и CCIV.

Таблица 4

Чувствительность полученных клеточных линий к вирусам рыб, выделяемым из патологического материала или накопленным на референсных линиях клеток

Вирус	Титры вирусов на разных культурах клеток					
	реф кл линия	ICO	SSO-1	SSO-2	SSF-1	SSF-2
SVCV	7,10±0,11*	7,10±0,13*	7,35±0,10*	7,35±0,12*	7,35±0,10*	7,35±0,13*
IHNV	9,10±0,11*	8,10±0,11*	5,85±0,11*	8,10±0,13*	-	-
VHSV	6,35±0,12*	6,35±0,20*	5,85±0,11*	4,85±0,11*	5,10±0,10*	-
EVEX	7,10±0,11 [□]	9,10±0,12 [□]	8,10±0,12 [□]	8,85±0,11 [□]	7,35±0,11 [□]	7,85±0,11 [□]
PFRV	8,60±0,14 [□]	7,35±0,11 [□]	7,85±0,10 [□]	7,85±0,10 [□]	7,85±0,12 [□]	7,35±0,11 [□]
"Hecht"	8,10±0,13 [□]	н и	8,85±0,12 [□]	8,10±0,11 [□]	7,10±0,13 [□]	7,10±0,12 [□]
ELTV	н и	-	5,10±0,12 [□]	7,35±0,13 [□]	5,10±0,11 [□]	7,35±0,11 [□]
IPNV	4,40±0,12*	-	-	-	-	-
CCIV	н и	5,70±0,15*	-	-	-	-
SSHV	6,10±0,13*	-	5,90±0,12*	6,10±0,12*	5,85±0,12*	5,35±0,12*

Примечание * - титр вируса в патматериале, lg ТЦД₅₀/г ткани, [□] - титр вируса, накопленного на референсной линии клеток, lg ТЦД₅₀/см³ культуральной жидкости, н и - не исследовали, - - признаков ЦПД не обнаружено

Таблица 5

Вирусрепродуцирующая активность клеточных линий по отношению к некоторым вирусам рыб (после 3-5 пассажей в культурах клеток)

Вирус	Титры вирусов на разных культурах клеток, lg ТЦД ₅₀ /см ³					
	реф кл линия	ICO	SSO-1	SSO-2	SSF-1	SSF-2
SVCV	8,10±0,12	9,10±0,14	6,10±0,11	8,60±0,11	6,10±0,12	8,60±0,12
IHNV	7,85±0,21	7,35±0,10	5,60±0,11	6,35±0,10	-	-
VHSV	9,10±0,11	8,60±0,15	7,85±0,10	5,10±0,11	-	5,10±0,11
EVEX	7,85±0,14	9,10±0,11	6,10±0,12	6,10±0,11	6,85±0,12	7,35±0,10
PFRV	8,35±0,12	9,10±0,10	6,85±0,12	8,85±0,13	8,35±0,10	8,85±0,12
"Hecht"	8,35±0,15	н и	5,35±0,11	7,35±0,10	7,35±0,12	7,35±0,12
ELTV	7,10±0,11 ^{□□}	-	5,85±0,10	5,35±0,12	4,35±0,11	6,10±0,11
IPNV	8,10±0,12	-	-	-	-	-
CCIV	6,00±0,12	5,70±0,13	-	-	-	-
SSHV	5,60±0,13 ^{□□}	-	5,35±0,13	5,85±0,11	5,85±0,13	5,40±0,13

Примечание ^{□□} - титр вируса после 2-х пассажей на референсной линии клеток, н и - не исследовали, - - признаков ЦПД не обнаружено

Примечательно, что линия SSF-1 выявляла вирус VHS при выделении его из патологического материала, однако к третьему passages *in vitro* цитопатический эффект вируса утрачивался. В то же время, линия SSF-2 вела себя прямо противоположным образом (табл. 4, 5). Наиболее чувствительными эти линии оказались к вирусу PFRV, а линия SSF-2 еще и к вирусу SVCV. Титры, в которых эти вирусы накапливались в SSF-1 и SSF-2, приближались к таковым для референсных линий, а нередко и превосходили их.

Таким образом, проведенные исследования показали, что полученные клеточные линии чувствительны к широкому спектру вирусов рыб разных таксономических групп и могут быть рекомендованы для их выявления, идентификации и изучения.

Время появления и характер ЦПЭ рабдовирусов в полученных и референсной клеточных линиях в целом не различались. ЦПЭ проявлялось в виде округления клеток, разрежения монослоя и появления клеток с длинными тонкими отростками, придающими пораженной культуре клеток вид сеточки.

ЦПЭ герпесвируса сибирского осетра в полученных линиях начиналось с появления множественных очагов округлых клеток, которые постепенно отделялись от субстрата. Отличительной особенностью ЦПЭ в культуре клеток SSF-2 было появление крупных округлых клеток увеличенных размеров, имевших форму близкую к шарообразной.

Жизнеспособность после криоконсервации по тесту витального окрашивания трипановым синим после хранения при температуре минус 70°C составила для клеток ICO - 75-80%, для клеток SSO-1 и SSF-1 – 90%, для клеток SSO-2 и SSF-2 – 80%. При оптимальных условиях культивирования клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства в течение 2 пассажей.

Контроль клеточных линий на посторонние контаминанты. При исследовании клеточных линий на наличие бактерий, грибов и микоплазм получены отрицательные результаты.

Видовая идентичность подтверждена молекулярно-генетическими методами.

Характеристика полученных перевиваемых линий клеток приведена в табл. 6.

Таблица 6

Характеристика полученных перевиваемых клеточных линий карпа и сибирского осетра

Показатели	Перевиваемые клеточные линии				
	ICO	SSO-1	SSO-2	SSF-1	SSF-2
Количество проведенных пассажей	690	225	190	225	225
Среда культивирования	2MEM	2MEM	199	2MEM	199
Сыворотка крови (СПК)	10%	10%	10%	10%	10%
Температура пролиферации, интервал/оптимум, °С	15-30/25	15-25/20	10-30/20-25	10-30/20	15-25/20
Состав диспергирующего раствора, трипсин (0,25%) версен (0,02%)	5 7	1 1,5	1 1,5	1 1,5	1 1,5
Коэффициент пересева	1 5	1 4-1 5	1 4	1 4-1 5	1 4
Посевная плотность клеток/см ²	3x10 ⁵	(9-12) x10 ⁴	3 x10 ⁴	(8-10) x10 ⁴	(13-15)x10 ⁴
Морфология клеток	эпителиоподобная	эпителиоподобная	фибробластоподоб	смешанная	фибробластоподоб
Размах варьирования числа хромосом	95-104 (59 пас) 71-178 (690 пас)	Не исследовали	186-371 (190 пас)	Не исследовали	Не исследовали
Модальное число хромосом	100 (59 пас) 90 (690 пас)	Не исследовали	364 (190 пас)	Не исследовали	Не исследовали
Величина модального класса	56% (59 пас) 36% (690 пас)	Не исследовали	44% (190 пас)	Не исследовали	Не исследовали
Жизнеспособность после криоконсервации	75-80%	90%	80%	90%	80%
Срок переживания монослоя без смены среды, сут	20-25	25-30	25-30	30-35	25-30
Вирусрепродуцирующая активность, lgТЦД ₅₀ /см ³	SVCV (9,1), IHNV (7,4), VHSV (8,6), PFRV (9,1), CCIV (5,7), EVEX (9,1)	SSHV (5,4), IHNV (5,6), VHSV (7,9), SVCV (6,1), EVEX (6,1), PFRV (6,9), ELTV (5,9), "Hecht" (5,4)	SSHV (5,9), IHNV (6,4), VHSV (5,1), SVCV (8,6), EVEX (6,1), PFRV (8,9), ELTV (5,4), "Hecht"(7,4)	SSHV (5,9), SVCV (6,1), EVEX (6,9), PFRV (8,4), ELTV (4,4), "Hecht" (7,4)	SSHV (5,4), VHSV (5,1), SVCV (8,6), EVEX (7,4), PFRV (8,9), ELTV (6,1), "Hecht" (7,4)
Контаминация посторонними агентами	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена

3 Выводы

1 При создании оптимальных условий культивирования, регулярной смен питательной среды и отборе наиболее жизнеспособных культур получены длительные переживающие (до 4-5 месяцев) первичные культуры клеток овариальной ткани неполовозрелого карпа, паренхиматозных органов и плавников сибирского осетра пригодные для последующего субкультивирования

2 Впервые получены и охарактеризованы по стандартному набору признаков перевиваемые линии клеток пула паренхиматозных органов и плавников сибирского осетра (SSO-1, SSO-2, SSF-1 и SSF-2) и линия клеток яичников неполовозрелого карпа (ICO) Предложена схема действий по получению монослойных перевиваемых клеточных линий рыб

3 Показано, что селекция активно пролиферирующих клеток, способных дать начало перевиваемым линиям, может быть осуществлена одним из двух путей 1 естественным отбором клеток в ходе продолжительного пассирования *in vitro* (SSF-1) 2) искусственным отбором с помощью метода дифференцированной дезагрегации клеточного монослоя (ICO, SSO-1, SSO-2 и SSF-2)

4 Оптимальная посевная плотность клеток, обеспечивающая высокий индекс пролиферации, значительный урожай клеток и продолжительную сохранность их в культуре, составляет ICO - 3×10^5 кл / cm^2 , SSO-1 – $(9-12) \times 10^4$ кл / cm^2 , SSO-2 – 3×10^4 кл / cm^2 , SSF-1 – $(8-10) \times 10^4$ кл / cm^2 , SSF-2 – $(13-15) \times 10^4$ кл / cm^2 Увеличение или уменьшение плотности посева клеток в два и более раз по сравнению с оптимально приводит к уменьшению индекса пролиферации, ранней дегенерации культуры разреженности монослоя или неспособности клеток к его образованию

5 Использование сред разного состава привело к получению из одних и тех же образцов донорской ткани перевиваемых клеточных линий, различающихся по свойствам Оптимальной питательной средой для культивирования перевиваемых линий клеток являются среды, на которых они были получены (Игла 2MEM для ICO, SSO-1 и SSF-1, среда 199 для SSO-2 и SSF-2) Клеточные линии, растущие в малокомпонентной среде Игла 2MEM, толерантны к изменению состава среды, тогда как перевод линий клеток, растущих в многокомпонентной среде 199, на другие питательные среды негативно отражается на их пролиферативной активности

6 Установлено, что на начальной стадии роста после очередного субкультивирования перевиваемых клеточных линий ICO и SSO-2 добавление в ростовую среду 10-20% сыворотки плода коровы оказывает защитное действие на клетки, способствуя быстрому началу их активной пролиферации В то же время, на

завершающей стадии пролиферации 20%-ное содержание сыворотки ингибирует рост клеток. Оптимальное содержание сыворотки в средах для роста обеих линий клеток составляет 10%.

7. Оптимальными температурами культивирования полученных перевиваемых линий клеток являются температуры, близкие к температурным оптимумам рыб-доноров ткани: ICO – 25°C, SSO-1, SSF-1 и SSF-2 - 20°C, SSO-2 - 20-25°C. Повышение температуры выше оптимальной на 5°C стимулирует бурный рост культур, быстро сменяющийся их дегенерацией. Понижение температуры до 10-15°C позволяет длительно сохранять клеточные линии в условиях лаборатории в жизнеспособном состоянии.

8. В результате кариотипирования установлено, что модальное число хромосом клеток линии ICO за более чем 600 пассажей изменилось со 100 (диплоидный набор) до 90 (гиподиплоидный набор). Модальный класс клеток линии SSO-2 составляет 364 хромосомы (гипотриплоидный набор). Выявлен широкий диапазон варьирования числа хромосом в клетках обеих линий: ICO – от 71 до 178, SSO-2 - от 186 до 371.

9. Все пять полученных линий клеток рыб (ICO, SSO-1, SSO-2, SSF-1 и SSF-2) чувствительны к широкому спектру вирусов рыб разных таксономических групп (семейств карповых, лососевых, угревых, щуковых и осетровых). Использование полученных линий клеток сибирского осетра позволило диагностировать первую вирусную болезнь осетровых рыб в России.

4 Практические предложения

Полученные перевиваемые линии клеток карпа и сибирского осетра используются в практической работе для диагностики вирусных болезней культивируемых рыб из семейств карповых, лососевых, угревых, щуковых и осетровых и в экспериментальных вирусологических работах.

Разработаны и предложены "Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб", утвержденные Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 10.10.1997 г с использованием перевиваемой линии клеток ICO.

Результаты работ положены в основу главы "Методы изучения вирусных болезней рыб" учебного пособия для студентов ВУЗов "Лабораторный практикум по болезням рыб" (под ред. В.А. Мусселиус, 1983).

Список опубликованных работ по материалам диссертации

- 1 Щелкунова, Т И Методы вирусологических исследований рыб/ Т Щелкунова, И С Щелкунов // Бауер, О Н Болезни прудовых рыб/ О Н Бауер, В Мусселиус, Ю А Стрелков - М Легкая и пищевая промышленность, 1981 – С 260-270
- 2 Щелкунова, Т И Методы изучения вирусных болезней рыб/ Т И Щелкунова И С Щелкунов // Лабораторный практикум по болезням рыб под ред В А Мусселиус М Легкая и пищевая промышленность, 1983 – С 131- 174 - (Учебное пособие для студентов высших учебных заведений)
- 3 Щелкунов, И С Мытье культуральной посуды отечественное средств «Афол» вместо импортного детергента 7X / И С Щелкунов, Т И Щелкунова Цитология - 1994 – Т 36, № 2 – С 215-218
- 4 Two continuous cell lines from carp, *Cyprinus carpio* L / I S Shchelkunov , Т Shchelkunova, О А Kupinskaya, О V Emelyanova // Dis Fish Shellfish 7th Intern Con EAFF, Palma de Mallorca, 1995 - P 49
- 5 Клеточные линии из тканей сибирского осетра/ Т И Щелкунова, О Купинская, Н А Машенко, И С Щелкунов // Первый конгресс ихтиологов России тезис докладов, Астрахань, 1997 – С 302-303
- 6 Щелкунов, И С Получение постоянных клеточных линий рыб, практически советы/ И С Щелкунов, Т И Щелкунова// Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры сб науч труд ВНИИПРХ - М ВНИРО, 2002 - Вып 78 – С 179-188
- 7 Shchelkunov, I S Theory and practice of establishing long-term cell lines from fis and shellfish/ I S Shchelkunov , Т I Shchelkunova // Aquatic & Marine Animal Health Second Bilateral Conference, Clarion Inn Conference Center Shepherdstown, West Virginia - 2003 – P 13
- 8 Весенняя виремия карпов/ Т Д Пичугина, М Н Борисова, Л А Завьялова, И С Щелкунов, Т И Щелкунова // Ветеринария - 2004 - № 5 – С 28-30
- 9 Щелкунова, Т И Температурно-ростовые характеристики постоянны клеточных линий, полученных из тканей сибирского осетра/ Т И Щелкунова, Ю П Колбасова, И С Щелкунов // Цитология - 2006 - Т 48, № 9 – С 814
- 10 Щелкунова, Т И Чувствительность к вирусам рыб постоянных клеточны линий, полученных из тканей сибирского осетра/ Т И Щелкунова, Ю П Колбасова И С Щелкунов // Цитология - 2006 - Т 48, № 9 – С 814-815
- 11 Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России/ И С Щелкунов, Т И Щелкунова, А И Щелкунов, Ю П Колбасова, Л В Диденко, А Ф Быковский / Российский вет журнал Сельскохозяйственные животные - 2007 - № 1 - С 10-12
- 12 Герпесвирусное заболевание молоди сибирского осетра/ И С Щелкунов Т И Щелкунова, А И Щелкунов, Ю П Колбасова, Л В Диденко, А Ф Быковский / Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата Материалы и докл Междунар симпоз - Астрахань АГТУ, 2007 – С 522-525