

Вірусіндуковані порушення хромосомного апарату

О. І. Євтушенко, В. П. Ширококов, Л. В. Павленко

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України
Бульвар Шевченка, 13, Київ, 01004, Україна

E. mail: alita@cmt.kiev.ua

Вивчено вплив внутрішньоутробної експериментальної ентеровірусної інфекції на хромосомний апарат плоду. Аналіз спектра цитогенетичних порушень в ембріональних клітинах мишей (поліплоїдія, анеуплоїдія, пробіли хромосом) свідчить, що вони залежать від типу вірусів і періоду вагітності.

Ключові слова: ентеровіруси, внутрішньоутробна інфекція, хромосомний апарат.

Вступ. У багатьох клінічних та експериментальних дослідженнях доведено, що значна кількість вірусів спричиняє хромосомні аберації *in vivo* та *in vitro*. До РНК-геномних належать: віруси жовтої гарячки, поліомієліту, сказу, паротиту, корі, краснухи, парагрипу, до ДНК-геномних — вірус оперізуючого лишаю, аденовірус, вірус простого герпесу, папіломи, гепатиту В, парвовіруси. Патогенний вплив вірусів проявляється у порушенні перебігу вагітності, розвитку ембріо- та фетопатій [1, 2].

На сьогодні поглиблено досліджуються тератогенні ефекти при ентеровірусній інфекції, при трансплацентарній передачі вірусів від матері до плоду [3]. Наслідками внутрішньоутробного вірусного інфікування можуть бути енцефалопатії, вроджені вади розвитку, гіпотрофія, смерть новонароджених [4, 5]. Певний внесок у формування перинатальної патології можуть робити ембріотоксична і мутагенна дія вірусів [6, 7]. Виявлено вищу чутливість хромосомного апарату ембріонів до впливу певних вірусів [8]. Однак подібні відомості стосовно ентеровірусів, які широко циркулюють у зовнішньому середовищі і серед людей, практично відсутні.

Метою представленої роботи було вивчення хромосомних порушень при експериментальних внутрішньоутробних ентеровірусних інфекціях, спричинених вірусами Коксаки В3 і поліовірусами ІІ типу, які часто виділяють у дітей з перинатальною патологією [9].

Матеріали і методи. *Тварини.* В експериментах використовували статевозрілих мишей-самок лінії С57В1/6 2—3-місячного віку масою 16—20 г, одержаних з розплідника віварію Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України. В період проведення експериментів утримання тварин, мікроклімат, температура, вологість, світловий режим, об'єм повітря, тип кліток відповідали загальноприйнятим нормативам утримання тварин відповідно до Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною метою. Загалом використано 50 тварин.

Клітинні культури. Для вірусологічних досліджень застосовували перещеплювані культури клітин ліній Vero (клітини нирок африканської зеленої мавпи), Нер-2 (клітини карциноми гортані людини). Пасивування цих клітин проводили за класичними методиками. Моношари одержували, використовуючи ростові середовища (суміші з рів-

них частин середовищ 199 та Ігла з додаванням 8—10 % сироватки великої рогатої худоби або 7 % ембріональної сироватки з антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином — 100 од/мл). Клітини культивували при температурі 36,6 °С. При пересівах (через 2—3 доби) для відділення від скла моношари обробляли 0,02 % розчином Версену.

Віруси. Вірус Коксаки В3 (штам Napsy) отримано з Інституту поліомієліту і вірусних енцефалітів АМН СРСР у 1983 році; використовували також селекціоновані генетичні варіанти вірусу Коксаки В3 — Абент⁺ і Абент⁻; віруси поліомієліту — вакцинні штами поліовірусів II типу (P712ch-2ab). Віруси культивували за класичною методикою з вірусомісним матеріалом у кількості, яка забезпечувала високу множинність інфікування моношарів клітин. Адсорбцію вірусів проводили протягом 30 хв, інкубацію здійснювали за температури 36,6 °С — для вірулентних та 34 °С — для вакцинних штамів, настання повного цитопатогенного ефекту (ЦПЕ) спостерігалось після 48—72 год.

Віруси концентрували із застосуванням природного сорбенту бентоніту. В основу оригінального методу покладено властивість ентеровірусів адсорбуватися на гелі бентоніту при кислих рН (4,5—5,0). При лужних рН (8,0—9,0) та відсутності двовалентних катіонів ентеровіруси здатні десорбуватися в розчин. Таким чином, концентрати одержували із об'ємів 500—1000 мл вірусомісного матеріалу [10].

Титри вірусів оцінювали за бляшкоутворенням під бентонітовим покриттям [11] та мікрометодом за ЦПЕ [12]. Принцип методів: інфекційні віруси під час репродукції спричиняють видимий ЦПЕ — повну деструкцію клітин, руйнування моношару. При застосуванні гелю бентоніту утворюються зони деструкції моношару клітин — бляшки. Вважають, що бляшка є результатом репродукції однієї вірусної часточки. Титри вірусів виражали в бляшкоутворюючих одиницях — БУО та ТЦД₅₀.

Селекцію бентонітових генетичних варіантів вірусів здійснювали за оригінальним методом, розробленим нами при виявленні феномену дисоціації ентеровірусів та дослідженні його закономірностей [13, 14]. Принцип методу полягає в тому, що частина популяцій ентеровірусів має високий афінитет до сорбенту бентоніту і адсорбується при нейтральних та слаболужних рН. Такий варіант популяції одержав символ Абент⁺, інший — мінор-

на для більшості штамів частина популяції (віруси з низьким афінитетом до бентоніту) — символ Абент⁻.

Схема експерименту. Мишей поділяли на групи. Внутрішньоутробну ентеровірусну інфекцію моделювали інтраперитонеальним введенням вірусів Коксаки В3 мишам, які знаходилися на 1-му і 3-му тижнях вагітності. Мишей першої групи інфікували вірусами вихідної популяції, другої — генетичним варіантом Абент⁺, третьої — варіантом Абент⁻ і четверту — вірусом поліомієліту II типу. Інфікуюча доза — 1·10⁶ БУО на мишу. Цитогенетичні дослідження здійснювали протягом 14 днів після зараження, визначаючи частоту хромосомних аберацій, кількість хромосом у клітинах плодів, а саме — печінки, селезінки, кісткового мозку новонароджених мишей [8, 15].

Методи статистичної обробки одержаних результатів. Для обробки та аналізу отриманих даних застосовували методи варіаційної статистики: оцінка вірогідності різниці між частотами появи ознаки в окремих серіях спостережень; порівняння середніх величин та середньоквадратичних відхилень. Для виявлення вірогідності різниці показників двох сукупностей, одержаних у процесі досліджень, визначали ступінь розходження їхніх середніх за допомогою *t*-критерію Ст'юдента.

Вірогідність різниці двох сукупностей та порівняння двох середніх оцінювали за параметричними та непараметричними критеріями (Ст'юдента, Віл-коксона, Колмогорова-Смирнова) [16, 17]. Використовували спеціалізовані програми статистичного аналізу «Statistica for Windows» та електронні таблиці «Excel Statistica 7,0» фірми Microsoft для комп'ютера 486 DX 2-66 AMD.

Результати і обговорення. Знайдено, що перші порушення структури і кількості хромосом у клітинах ембріонів і плодів при внутрішньоутробній ентеровірусній інфекції реєструються через 24 год після зараження, досягаючи максимальних значень на 3—4-ту добу. Через 14 діб після інфікування рівень аберантних метафаз знижується, однак все ще достовірно перевищує контрольний рівень.

Найбільше уражується генетичний апарат клітин ембріонів мишей вірусом Коксаки В3 на 6—8-й день вагітності (стадія органогенезу). Серед структурних аномалій спостерігаються розриви і пробіли хромосом, а також передчасне розходження хромосом по центромері. Відмічається збільшення в чо-

тири рази порівняно з контролем кількості анеуплоїдних клітин, виключно за рахунок гіпоплоїдії із втратою 1—5-ї хромосом.

Аналогічний спектр цитогенетичних порушень спостерігали в клітинах плодів при інфікуванні вірусом Коксаки В3 на третьому тижні вагітності. Звертає на себе увагу нижчий рівень клітин з хроматидними розривами і пробілами — відповідно 3,1 і 4,6 % проти 5,5 і 10,6 % на першому тижні. У той же час, за кратністю перевищення контрольного рівня збільшується частка клітин з хромосомами, які передчасно розділилися по центромері.

Кількість і характер хромосомних аберацій у клітинах ембріонів при поліовірусній інфекції були практично однаковими при зараженні як на першому, так і третьому тижнях вагітності. Кількість хроматидних розривів перевищувала контрольний рівень в 1,3 та 1,5 рази відповідно. Збільшувалася також кількість анеуплоїдних клітин у 3,06 і 4,25 рази. Найчастіше (у 9,7 % випадків) спостерігали клітини з передчасним розходженням хромосом по центромері. Можливо, цей тип порушень обумовлений особливостями впливу поліовірусу на центромерну ділянку або на хроматиновий апарат клітин кісткового мозку мишей.

Популяція ентеровірусів є гетерогенною. Вона представлена генетичними бентонітовими варіантами Абент⁺ і Абент⁻, які відрізняються за низкою фізико-хімічних і біологічних властивостей. Тому в наших дослідженнях використано генетичні варіанти вірусу Коксаки В3 (Nancy), які різняться за афінитетом до природного сорбенту — бентоніту і позначаються як варіанти Абент⁺ і Абент⁻ [11].

В умовах експериментальної внутрішньоутробної ентеровірусної інфекції виявлено, що кількість клітин із розривами хромосом при зараженні варіантом Абент⁻ на третьому тижні вагітності в 2,01 рази перевищує цей показник для варіанту Абент⁺. Варто зазначити, що й за всіма іншими зареєстрованими в наших експериментах типами порушень хромосомного апарату (пробіли хромосом, хромосоми, які передчасно розійшлися по центромері, поліплоїдія, анеуплоїдія) спостерігається достовірне кількісне домінування негативних ефектів, пов'язаних із дією варіанту Абент⁻.

Висновки. Проведені дослідження і одержані статистично достовірні дані дозволяють зробити певні висновки. Рівень і характер цитогенетичних порушень в ембріональних клітинах значною мірою залежать від типу і генетичних властивостей

вірусів, а також від строку вагітності, на якому відбулося інфікування. Вірогідно, що внутрішньоутробна ентеровірусна інфекція, яка призводить до суттєвого ушкодження хромосомного апарату клітин плодів, є однією з причин спонтанних абортів, мертвонароджуваності, різних видів вродженої патології.

A. I. Yevtushenko, V. P. Shirobokov, L. V. Pavlenko

Virus-induced breach of chromosome apparatus

Summary

The article is devoted to the investigation of the influence of intrauterine experimental enterovirus infection on the fetus chromosome apparatus. The analysis of a spectrum of cytogenetical breach in embryonic cells of mice (polyploidy, aneuploidy, the gaps in chromosomes) testifies, that these abnormalities depend on the species, type of viruses, the period of pregnancy.

Key words: enteroviruses, intrauterine infection, chromosome apparatus.

A. И. Евтушенко, В. П. Ширококов, Л. В. Павленко

Вирусиндуцированные нарушения хромосомного аппарата

Резюме

Изучено влияние внутриутробной экспериментальной энтеровирусной инфекции на хромосомный аппарат плода. Анализ спектра цитогенетических нарушений в эмбриональных клетках мышей (полиплоидия, анеуплоидия, пробелы хромосом) свидетельствует о том, что они зависят от типа вирусов и периода беременности.

Ключевые слова: энтеровирусы, внутриутробная инфекция, хромосомный аппарат.

PERELIK LITERATURY

1. Piersantelli N., Guida B., Robert L. Problemi di profilassi prenatale delle infezioni da virus // Ann. Sclavo.—1976.—18.—P. 393—446.
2. Arechavaleta-Velasco F., Koi H., Shrauss J. F. 3th, Parry S. Viral infection of the trophoblast: time to take a serious look at its role in abnormal implantation and placentation // J. Reprod. Immunol.—2002.—55.—P. 113—134.
3. Strong B. S., Young S. A. Intrauterine Coxsackie virus, group B type 1, infection: viral cultivation from amniotic fluid in the third trimester // Amer. J. Perinatol.—1995.—12.—P. 78—79.
4. Enders G. Le infezioni perinatali // Rio. Clin. Lab.—1988.—18, Suppl. 1.—P. 109—116.
5. Ventura K. C., Hawkins H., Smith M. B., Walker D. H. Fatal neonatal echovirus 6 infection: autolysis case report and review of the literature // Mod. Pathol.—2001.—14.—P. 85—90.
6. Бужиевская Т. И. Вирусиндуцированный мутагенез в клетках млекопитающих.—Киев: Наук. думка, 1984.—132 с.
7. Ильинских Н. Н., Бочаров Е. Ф., Ильинских И. Н. Инфекционный мутагенез.—Новосибирск: Наука, 1984.—190 с.
8. Бышовец Т. Ф. Чувствительность хромосомного аппарата материнских клеток и клеток плода к действию вируса гриппа в эксперименте // Цитология и генетика.—1975.—9, № 1.—С. 19—21.
9. Лозовская Л. С., Соболева В. Д., Хелленов Э. А. Вер-

- тикальная передача некоторых энтеровирусов человека и хроническая форма врожденной Коксакивирусной инфекции // Энтеровирусы. Общетеоретические и медицинские аспекты: Материалы Всесоюз. конф. (Киев, март, 1991 г.).—Киев, 1991.—С. 66—67.
10. Широбоков В. П., Гирин В. Н., Якименко А. И., Землянский В. В., Корнюшенко О. Н., Евтушенко А. И. Применение бентонита для выявления энтеровирусов у человека и во внешней среде // Метод. рекомендации.—Киев, 1986.—22 с.
 11. Широбоков В. П. Использование бентонитового покрытия для титрования энтеровирусов методом бляшек // Вопр. вирусологии.—1973.—№ 5.—С. 611—615.
 12. Руководство по вирусологическим методам (Manual for the virological investigation of polio, WHO).—Москва, 1998.—114 с.
 13. Широбоков В. П. Дифференциация вирусов Коксаки по характеру адсорбции на бентоните // Acta virol.—1968.—N 12.—С. 185.
 14. Широбоков В. П. Сравнительное изучение биологических свойств вирусов Коксаки и их селекционированных вариантов: Автореф. дис. д-ра мед. наук // Киевский НИИ инфекционных болезней.—Киев, 1977.—36 с.
 15. Куринный А. И. Новый метод приготовления препаратов хромосом эмбрионов млекопитающих // Цитология и генетика.—1969.—№ 5.—С. 453—456.
 16. Ланач С. Н., Чубенко А. В., Бабич Л. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Экспериментальные исследования. Клинические испытания. Анализ фармацевтического рынка.—К.: Морион, 2000.—319 с.
 17. Минцер О. П., Угаров Б. Н., Власов В. В. Методы обработки медицинской информации.—К.: Выща школа, 1991.—271 с.

УДК 616.9-092:578.835.1:57.017.642:576.316
Надійшла до редакції 05.07.04