

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного

На правах рукопису

МОЙСА

Лариса Миколаївна

**СОРБЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ КОРОНАВІРУСУ СВИНЕЙ
ПРИ ІММОВІЛІЗАЦІЇ НА НЕОРГАНІЧНИХ ПОЛІМЕРАХ**

03.00.06 - вірусологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1995

548
978



Дисертація в рукописі 00761642 (Q)

Робота виконана в лабораторії технології культивування вірусів
Інституту ветеринарної медицини УААН

Науковий керівник: доктор ветеринарних наук,
член-кореспондент УААН
СОБКО А.І.

Науковий консультант: кандидат біологічних наук,
БОЙКО І.І.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
член-кореспондент НАН
ДЯЧЕНКО Н.С.
доктор медичних наук,
проф. н.с. **ГЛОБА Л.І.**

Провідна установа: Київський Національний
університет ім. Т.Г.Шевченко

Захист дисертації відбудеться 20 грудня 1995 р. о 10 год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.81.01 при
Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного
НАН України.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту мік-
робиології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

Автореферат дисертації розісланий 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Л.М.Пуріш - **Л.М.Пуріш**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Представники родини Coronaviridae викликають широкий спектр захворювань людини та тварин з ураженням переважно респіраторного та шлунково-кишкового трактів (Л.Я.Закстельська, А.В.Шебоддов, 1977). Коронавірус свиней - збудник трансмісивного гастроентериту (Porcine transmissible gastroenteritis virus) є головним етіологічним агентом інфекційних ентеритів, що призводять до тяжкого діарейного захворювання новонароджених поросят з високим рівнем смертності. Інфекція завдає суттєвих економічних збитків розвитку промислового тваринництва, як на Україні, так і в багатьох країнах світу. Ситуація ускладнюється через те, що сучасні засоби специфічної профілактики недостатньо ефективні для боротьби з коронавірусним гастроентеритом. У значній мірі це пояснюється особливостями пато- та імуногенезу ТГС, який є строго локальною кишковою інфекцією. Збудник уражає епітеліальні клітини тонкого відділу кишечника - ентероцити, викликаючи атрофію ворсинок, порушення функції всмоктування та дегідратацію організму. Віруснейтралізуючі секреторні антитіла - Ig A, які продукуються лімфоїдною тканиною кишечника, становлять основу лактогенного імунітету, забезпечуючи пасивний захист новонароджених тварин.

Враховуючи ці особливості захворювання, пероральний спосіб застосування вакцин є природним та фізіологічно звичним для організму шляхом попадання вірусних антигенів, що призводить до розвитку швидкої та пролонгованої імунної відповіді, яка закріпилася в процесі філо- та онтогенезу.

Проте у випадку з ТГС основна проблема полягає у ефективному використанні даного способу імунізації тварин. Це пов'язано зі аміною фізико-хімічних властивостей польових штамів коронавірусу при їх атенуації, які стають більш лабільними до дії кислого середовища та протеолітичних ферментів шлунково-кишкового тракту свиней. Існуючі в наш час технології виробництва пероральних форм вакцин вимагають використання високих доз вірусного антигену, що економічно недоцільно.

Одним із перспективних напрямків для вирішення цієї проблеми є застосування носіїв різної природи для іммобілізації вірусного антигену з метою підвищення його специфічної активності. У цьому відношенні важливого практичного значення набуває питання кількісної оцінки сорбційних властивостей таких матеріалів для відбору найбільш ефективних та економічно доступних. Відомо також, що здатність вірусів взаємодіяти з неорганічними субстратами відбиває їх біологічні особливості, проте для складноорганізованих коронавірусів така залежність практично не вивчалась.

Мета та завдання дослідження. Мета даної роботи полягала у вивченні сорбційних властивостей коронавірусу свиней на моделі збудника ТГС та особливостей його взаємодії з мінеральними носіями природного та синтетичного походження.

Основними завданнями роботи були:

1. Визначити оптимальні умови взаємодії вірусу ТГС з високодисперсними матеріалами - бентонітом та аломоверсилом. Вивчити вплив деяких факторів на ефективність іммобілізації (часу експозиції з носієм, рН середовища і концентрації сорбенту).

2. Шляхом кінетичного аналізу експериментальних ізотерм дати кількісну оцінку величини максимальної сорбції та сту-

пеню афінитету коронавірусу щодо неорганічних субстратів.

3. На моделях референтного та вакцинного штамів вірусу ТГС провести порівняльне вивчення їх сорбційної здатності при іммобілізації на бентоніті.

4. Дати порівняльну оцінку сорбційній активності природного та синтетичного алюмосилікатів відносно коронавірусу ТГС.

У роботі використовувався комплекс вірусологічних, фізико-хімічних та математичних методів.

Наукова новизна та практична цінність роботи. Вперше на моделі збудника трансмісивного гастроентериту свиней проведено вивчення особливостей взаємодії складноорганізованих коронавірусів з дисперсними матеріалами природного та синтетичного походження. Шляхом кінетичного аналізу експериментальних ізотерм дана кількісна оцінка величини максимальної сорбції та ступеню афінитету коронавірусів на неорганічних субстратах. Вивчені умови сорбції вірусу ТГС мінеральними носіями. Встановлено, що на ефективність іммобілізації впливають такі фактори, як тривалість взаємодії, рН середовища і концентрація сорбенту у дисперсній системі.

На моделях вірулентного та атенуйованого штамів вірусу ТГС проведено порівняльне вивчення їх сорбційної здатності при іммобілізації на природному алюмосилікаті - бентоніті. Показано, що здатність референтного штаму "Пурд"ю-115" формувати агрегати віріонів на поверхні дисперсного мінералу підвищує його сорбційний потенціал порівняно з вакцинним ізолятом "Римс".

В даній роботі вперше виявлено істотні відмінності функціональної активності природних та синтетичних сорбентів стосовно коронавірусу. На основі використання моделі ізотер-

ми Хіла-де Буря дана кількісна оцінка максимальній сорбції та ступеню спорідненості вірусу ТГС до бентоніту та алюмоавросиліду. Встановлено, що сорбційна ємність природного алюмосилікату значно вища, ніж у пірогенного кремнезему і становить відповідно $83,29 \cdot 10^6$ БУО/мг та $55,29 \cdot 10^4$ БУО/мг.

Результати досліджень становлять інтерес для уявлення про поведінку та циркуляцію коронавірусів у природному середовищі - ґрунті та воді. Важливо також відзначити, що глибокий аналіз сорбційної взаємодії вірусу ТГС з неорганічними субстратами дозволяє краще пізнати фундаментальні закономірності цього процесу і в мікрогетерогенній системі - *in vivo*.

Практична цінність роботи полягає у тому, що отримані в ній результати про різну сорбційну активність природних та синтетичних матеріалів дозволяють більш ефективно та цілеспрямовано проводити відбір носіїв із заданими адгезивними властивостями для реалізації біотехнологій, що ґрунтуються на використанні іммобілізованого вірусу ТГС або його антигенів і в першу чергу - для розробки та виробництва нового покоління вакцинних препаратів проти коронавірусного гастроентериту.

Порівняльне вивчення сорбційної здатності референтного та вакцинного штамів вірусу ТГС свідчить про перспективність простих і нехроматографічних методів в плані кількісного та аналітичного підходу при дослідженні біологічних особливостей коронавірусів та розробки на їх основі малоруйнівних методів концентрування та очистки цих високолабільних вірусів.

Отримані дані становлять практичний інтерес для розробки та вдосконалення технологій великомасштабного культивування клітин та вірусів з використанням мікроносіїв.

Запропонований сорбційно-кінетичний підхід може бути

вастосований для стандартизації якості та специфічної активності ад'ювантів та ентеросорбентів.

Результати досліджень впроваджені в педагогічний процес на кафедрі вірусології КДІВЛ МОЗ України.

За матеріалами дисертації розроблено доступний та ефективний спосіб отримання антигенного препарату вірусу ТГС на основі використання природного алюмосилікату - бентоніту.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, результатів досліджень, висновків та списку літератури, який включає 208 найменувань. Робота викладена на сторінках машинописного тексту та містить 16 рисунків, 5 фотографій і 8 таблиць.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на I Республіканській конференції по біотехнології (м.Львів, 1990), Всесоюзній конференції по ентеровірусам (м.Київ, 1991), XII Українському республіканському з'їзді мікробіологів, епідеміологів та паразитологів (м.Харків, 1991), III Всесоюзній конференції по епізоотології (м.Новосибірськ, 1991), III Міжнародній конференції по проблемам медицини катастроф (м.Київ, 1992).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових робіт.

Робота дисертантом виконана самостійно у відповідності з Державним планом НДР по Програмі: "Продовольство-95" "Ветеринарне забезпечення" 02.19 "Розробити та засвоїти технологію великомасштабного культивування клітин та вірусів для виробництва асоційованих вакцин проти корона-, рота-інфекцій, хвороби Ауески".

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Як експериментальні моделі вірусу ТГС використовували референтний (вірулентний) штаб "Пурд"ю-115", отриманий із ВДНКІ ветпрепаратів та вакцинний (атенуйований) штаб "Римс", реізолъований із комерційної ліофілізованої вакцини виробництва НДР (серія 160 О1 81). Віруси були добре адаптовані для репродукції у перещеплювальній культурі клітин нирок ембріонів свиней (лінія СНЕВ-М) і пройшли в ній по 15 - 20 пасажів.

Вибір названих штабів був обумовлений тим, що їх вірусні популяції істотно диференціюються за основними генетичними ознаками. Так, під агаровим живильним середовищем віруси утворювали чіткі, але різні за своїми розмірами бляшки (S - ознака): у вакцинного ізолята в структурі популяції переважали дрібні бляшки (менше 1 мм), а у еталонного штаба основна частина вірусної популяції формувала бляшки діаметром 2-3 мм і більше. Крім цього, модельні віруси відрізняються і за іншими генетичними характеристиками, такими як T-, T_r- та pH_{3,0}-ознаки (Б.О.Краснобаєв, А.І.Собко, О.Г.Дерябіна та спів., 1990). Враховуючи ці біологічні особливості досліджуваних штабів, важливого значення набувало порівняльне вивчення їх сорбційної здатності при іммобілізації на мінеральних носіях.

Інфекційну активність вірусу ТГС визначали шляхом титрування за бляшкоутворенням на моношаровій культурі клітин СНЕВ-М. На кожне розведення вірусу використовували не менше трьох тест-об'єктів.

Для іммобілізації модельних штабів застосовували мінеральні сорбенти природного та штучного походження - високодисперсний бентоніт у формі 5 %-ного гелю та модифікований оксидом алюмінію пірогенний кремнезем - алумоаеросил, синте-

зований в Інституті хімії поверхні АН України.

Ефективність іммобілізації вірусу ТГС оцінювали за різницею його титрів в контрольних (без сорбенту) та дослідних аразках (із сорбентом) в розрахунку на одиницю маси носія (БУО/мг).

Кількісну характеристику взаємодії коронавірусу з дисперсними матеріалами проводили шляхом отримання та побудови ізотерм з їх математичною інтерпретацією. Ізотерми сорбції з моношаровим заповненням активних центрів носія описували за допомогою рівняння Ленгмюра, а для апроксимації більш складних сигмоїдних кривих застосовували модель полішарової адсорбції БЕТ та рівняння ізотерми Хіла-де Бура. Особливості адсорбції вірусу ТГС на бентоніті вивчали з використанням техніки електронно-растрової мікроскопії.

Результати власних досліджень обробляли статистично за загальновідомими методиками (Н.О.Плохинський, 1961; В.Ю.Урбах, 1963; Лоренц Р., Бегель К., 1975).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кінетика сорбції вірусу ТГС на дисперсних матеріалах

Для отримання надійних сорбційних даних насамперед визначали час, необхідний для досягнення рівноважного стану у дисперсній системі вірус-сорбент. Встановлено, що сорбція коронавірусу на мінеральних носіях практично завершується на протязі 30 хв. Кінетичні криві, апроксимовані за допомогою рівняння асимптотичної функції, відповідали кінетиці реакцій першого порядку (рис. 1).

Аналіз впливу реакції середовища на кінетику сорбційної рівноваги показав, що при іммобілізації вірусу ТГС на при-

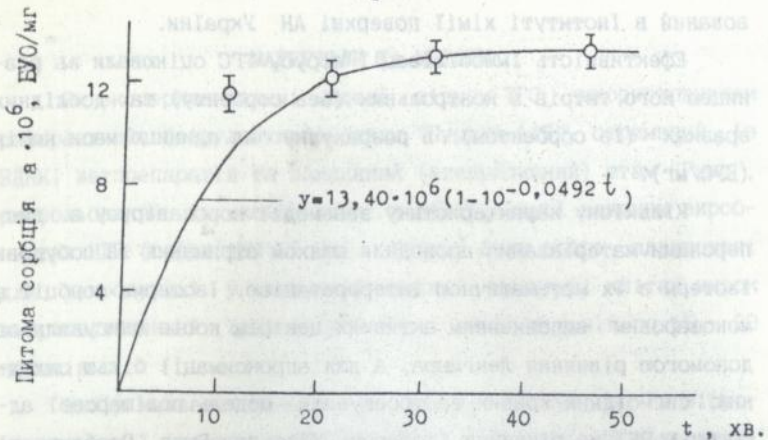


Рис. 1. Кінетика сорбції вірусу ТГС штам "Пурд'ю-115" на бентоніті: $C_0 = (4,76 \pm 0,33) \cdot 10^6$ ЕУО/мл, рН 6,25

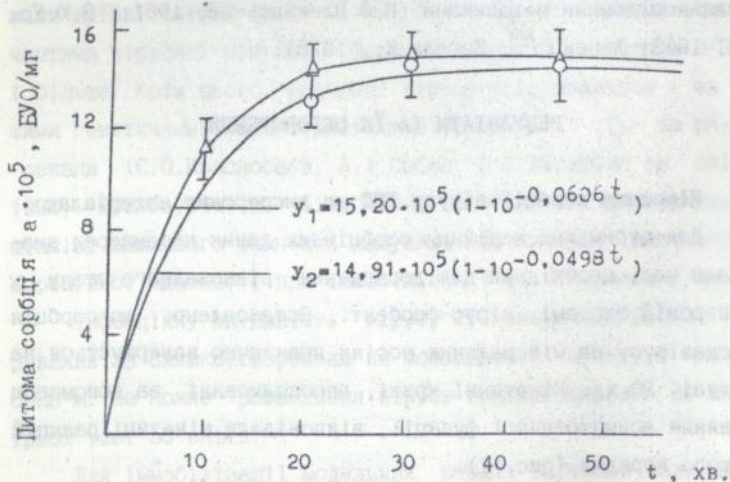


Рис. 2. Вплив рН середовища на кінетику сорбційної рівноваги у системі коронавірус ТГС - бентоніт: y_1 - рН 3,50, y_2 - рН 6,20; $C_0 = (5,31 \pm 0,47) \cdot 10^5$ ЕУО/мл

родному алюмосилікати в умовах кислих значень рН спостерігається тенденція до зростання початкової максимальної швидкості адсорбції, що відповідає величині першої похідної рівняння асимптотичної функції при $t=0$ (рис. 2). При сорбції вірусу на пірогенному кремнеземі така тенденція була відсутня. Результати досліджень добре співпадають з літературними даними, за якими сорбція вірусів найчастіше завершується на протязі декількох десятків хвилин (Schaub S.A., Sagik B.P., 1975; Schiffenbauer M., Stotzky G., 1982).

Вплив рН середовища на сорбційні властивості модельних вірусів.

При дослідженні впливу рН середовища на ефективність іммобілізації встановлено, що збільшення концентрації іонів водню в дисперсійному середовищі призводить до зростання величини питомої сорбції коронавірусу ТГС на бентоніті, проте характер рН-залежності для модельних штамів суттєво відрізнявся. Так, для референтного штаму "Пурд"ю-115" в нейтральній та слабокислих зонах адсорбція мало залежить від величини рН і лише при значенні $pH < 5,0$ цей показник різко зростає. Показано, що рН-залежність для вакцинного штаму має куполоподібний вигляд в максимумом при рН 3,9 (рис. 3). Для математичної апроксимації отриманих кривих застосовували рівняння гіперболічної функції.

Значне підвищення рівня сорбції для референтного штаму при $pH < 5,0$ є, очевидно, результатом агрегації його віріонів в ізоелектричній зоні. Подібне явище встановлено для фагів T2 та MS 2 при їх взаємодії з монтморилонітом (Л.І.Глоба, 1988). Для вакцинного ізоляту "Римо" оптимум сорбції при рН 3,9 пов'язаний, можливо, з агрегативною стійкістю віріонів в і.е.в., яка відображує структурні та функціональні особли-

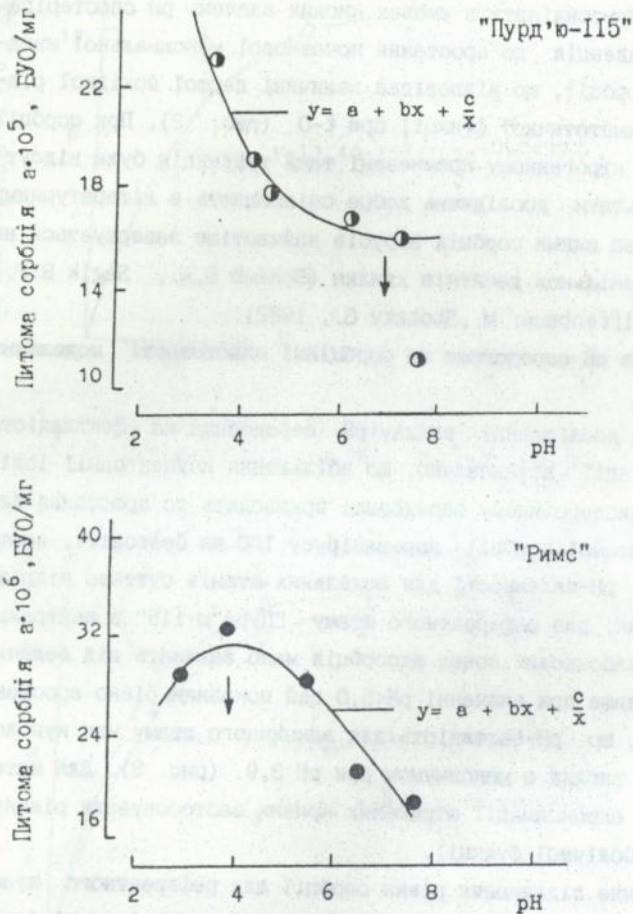


Рис. 3. рН - залежність величини питомої сорбції модельних штамів вірусу ТГС на бентоніті.

Теоретичні значення параметрів рівняння:
 для штаму "Пурд'ю-115" ($\times 10^5$): $a = -8,30$, $b = 1,79$,
 $c = 83,63$; для штаму "Римс" ($\times 10^6$): $a = 89,35$,
 $b = -7,44$, $c = -113,06$.

Стрілками показано мінімальне (рН 6,83) та максимальне (рН 3,90) значення питомої сорбції відповідно для штамів "Пурд'ю-115" та "Римс".

вості поверхневих білків атенуйованого штаму коронавірусу.

Залежність ефективності іммобілізації вірусу ТГС від концентрації носія.

Досліджено, що зменшення концентрації природного алюмосилікату у дисперсній системі призводить до зростання кількості іммобілізованих вірусних часток на одиницю маси носія. На форму концентраційних кривих впливали біологічні особливості коронавірусу. Так, отримані для вакцинного ізоляту експериментальні криві добре відповідали експоненційному закону, а для референтного вірусу більш адекватною виявилась модель двоекспоненційної функції. В напівлогарифмічних координатах для штаму "Римс" дослідні дані утворювали прямолінійну залежність, а для штаму "Пурд"ю-115" вони склалися із двох лінійних ділянок, які перетиналися під певним кутом. Способом найменших квадратів визначали кінетичні показники (табл.1), на основі яких будували теоретичні криві (рис.4).

Таблиця 1. Апроксимаційні дані для концентраційних кривих в залежності від рН середовища.

Штам вірусу ТГС	рН	C_1 , БУО/мг	k_1	C_2 , БУО/мг	k_2
"Пурд"ю-115"	7,35	$54,60 \cdot 10^6$	-15,69	$41,64 \cdot 10^6$	-2,54
	6,20	$74,12 \cdot 10^6$	-20,65	$22,72 \cdot 10^6$	-2,27
	3,50	$71,41 \cdot 10^6$	-16,68	$50,86 \cdot 10^6$	-3,54
"Римс"	7,25	-	-	$29,66 \cdot 10^6$	-2,38
	6,20	-	-	$38,64 \cdot 10^6$	-2,92
	5,10	-	-	$52,04 \cdot 10^6$	-3,37

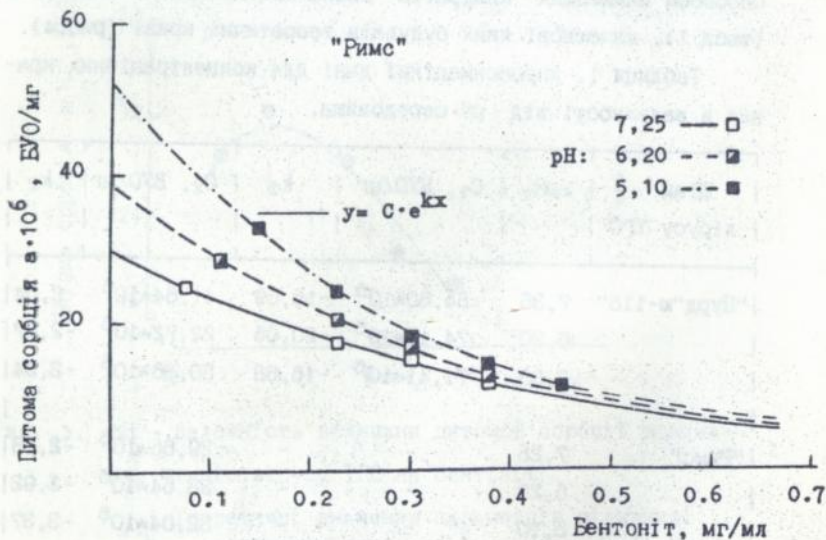
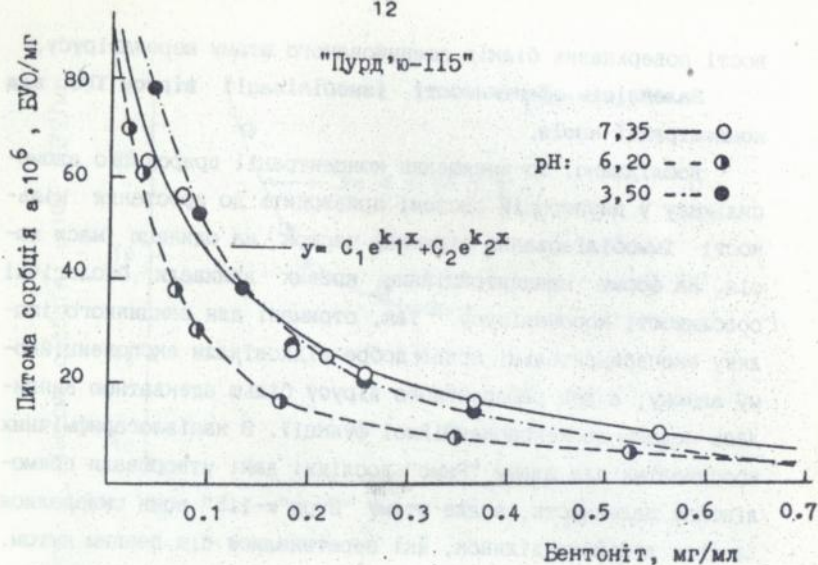


Рис. 4. Залежність величини сорбції модельних штамів вірусу ТГС від концентрації бентоніту для різних значень pH дисперсійного середовища.

"Аномальну" форму концентраційних кривих в області низьких доз сорбенту можна пояснити, очевидно, формуванням агрегатів віріонів вірусу ТГС з бентонітом, який має здатність до самодиспергування та пептизації у водному середовищі, за рахунок чого збільшується його питома поверхня (Б.Г.Куковський, 1966). В діапазоні високих концентрацій зростає число контактів між часточками природного мінералу, що призводить до утворення коагуляційної структури. Це створює стеричні перешкоди для сорбції коронавірусу на вільних ділянках поверхні носія, знижуючи, таким чином, величину питомої сорбції. Подібне явище описано при взаємодії різних високомолекулярних сполук з глинистими мінералами (Ю.І.Тарасевич, 1985) та оксидами металів (Б.Е.Платонов, 1981).

Порівняльна характеристика сорбційної здатності модельних штамів вірусу ТГС при іммобілізації на бентоніті.

Вивчення сорбційних властивостей референтного та вакцинного штамів вірусу трансмісивного гастроентериту свиней здійснювали методом отримання та побудови ізотерм. Такий підхід дозволяє кількісно охарактеризувати два основних сорбційних показники - величину максимальної сорбції вірусу ($a_{\text{макс.}}$) та константу сорбційної рівноваги (K), що визначає ступінь афінитету коронавірусу до неорганічного субстрату.

Встановлено, що ізотерми сорбції вакцинного штаму "Римс" на бентоніті, отримані для різних значень рН, становили сукупність кривих "ленгмюрівського" типу (рис. 5). В лінійній формі рівняння Ленгмюра експериментальні дані утворювали прямолінійну залежність, що підтверджує правомірність застосування моделі моношарової адсорбції для опису цих ізотерм. Аналіз впливу реакції середовища показав, що максимальний

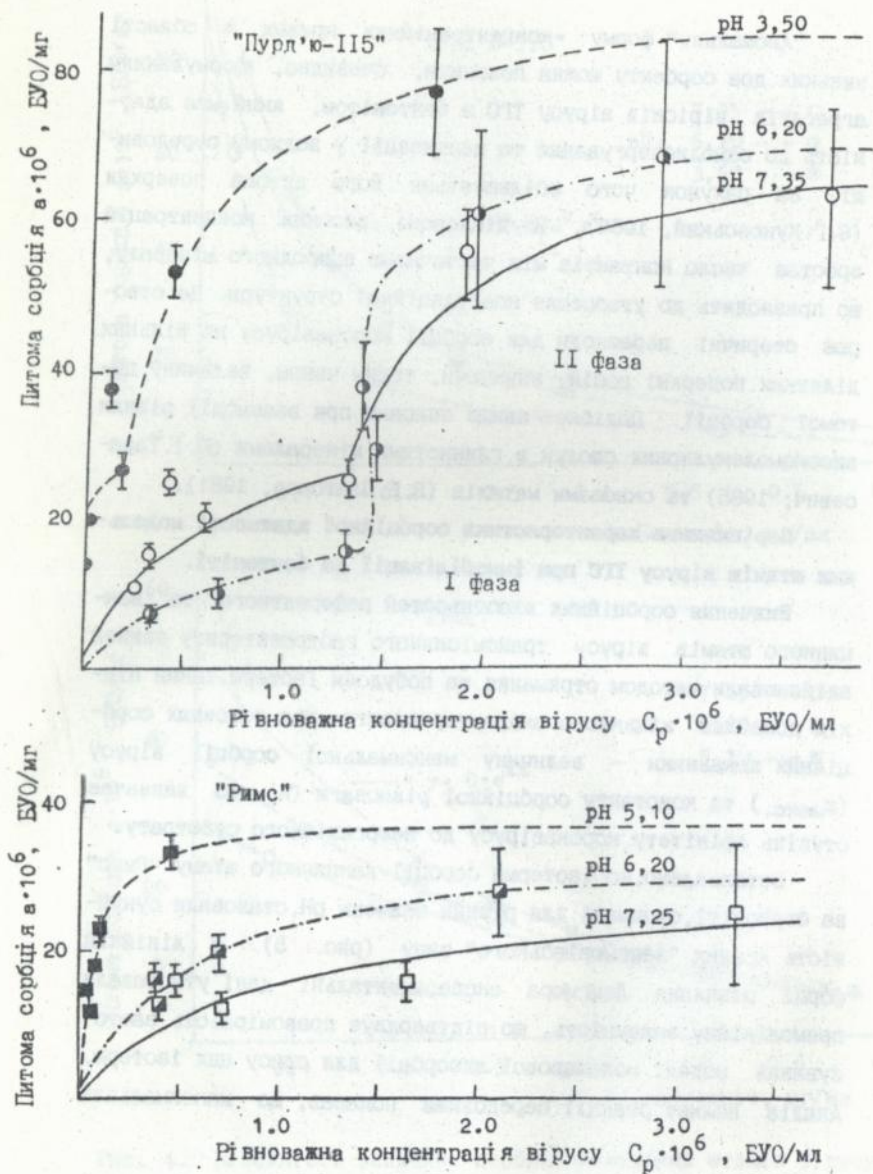


Рис. 5. Ізотерми сорбції модельних штамів коронавірусу ТГС на бентоніті.

рівень сорбції атенуйованого штаму вірусу ГС на бентоніті не залежить від величини рН і становить $(26,32 \pm 6,96) \cdot 10^6$ БУО/мг, $(34,85 \pm 3,56) \cdot 10^6$ БУО/мг та $(30,80 \pm 5,74) \cdot 10^6$ БУО/мг відповідно для значень рН 7,25, рН 6,20 та рН 5,10, а їх середньозважувана величина складає $(28,69 \pm 3,50) \cdot 10^6$ БУО/мг. Встановлено, що константа сорбційної рівноваги, яка характеризує ступінь афінитету коронавірусу до активних центрів сорбенту, вірогідно збільшується у кислому середовищі. Так, для цих діапазонів рН величина початкової максимальної швидкості адсорбції, що відповідає першій похідній рівняння Ленгмюра при $C_p=0$ і пропорційна константі рівноваги, зростає від значення 47,11 та 65,87 до $10,37 \cdot 10^2$ (в мл/мг).

На відміну від вакцинного ізоляту, ізотерми сорбції вірулентного штаму "Пурд"ю-115" на природному алумосилікаті мали більш складний бімодальний характер (рис.5). В лінійній формі рівняння Ленгмюра ізотерми утворювали дві прямолінійні залежності. Сорбційні показники - $a_{\text{макс}}$ і K розраховували із першої лінійної ділянки, екстрапольованої до осі ординат. Встановлено, що максимальна сорбція референтного штаму на рівні моношарового заповнення активних центрів сорбенту не залежить від реакції середовища і для значень рН 7,35, рН 6,20 та 3,50 середньозважувана величина дорівнює $(28,25 \pm 3,44) \cdot 10^6$ БУО/мг, що відповідає аналогічному показнику для штаму "Римс". Для цих значень рН величина початкової швидкості адсорбції вірогідно підвищується від 76,08 та 25,46 до $45,53 \cdot 10^3$ (в мл/мг), що свідчить про зростання ступеню афінитету вірулентного штаму до активних центрів дисперсного мінералу у кислому середовищі.

Таким чином, рівняння Ленгмюра адекватно описує початкову фазу бімодальних ізотерм, обмежену ємністю адсорбційно-

го моношару. У ході подальшого кінетичного аналізу було встановлено, що для апроксимації сигмоїдних ізотерм референтного штаму "Пурдю-115" на бентоніті найбільш адекватною є модель моношарової нелокалізованої адсорбції - рівняння Хіла-де Бура у вигляді:

$$C_p = \frac{\theta}{(1-\theta)K_1} \cdot \exp \left[\frac{\theta}{1-\theta} - K_2\theta \right]$$

де θ - відносна ступінь заповнення поверхні; K_1 - константа сорбційної рівноваги, що характеризує взаємодію коронавірусу з поверхнею сорбенту, мл/БУО; K_2 - константа сорбційної рівноваги, що враховує взаємодію віріонів в адсорбційному шарі.

Розрахунок кінетичних показників здійснювали за лінійною формою рівняння:

$$\frac{\theta}{1-\theta} + \ln \frac{\theta}{1-\theta} - \ln C_p = \ln K_1 + K_2\theta$$

Із нахилу прямої лінії шляхом екстраполявання до нуля, визначали константу K_2 , а із відрізка прямої на осі ординат знаходили величину K_1 . Показано, що розраховані на основі отриманих показників теоретичні ізотерми добре відповідали експериментальним даним в межах стандартної похибки (рис. 5). При цьому величини гранично можливої сорбції референтного штаму "Пурд"ю-115" вірусу ТГС на бентоніті для значень рН 7,35, рН 6,20 та 3,50 вірогідно не відрізнялися і становили відповідно $79,88 \cdot 10^6$ БУО/мг, $83,29 \cdot 10^6$ БУО/мг та $69,69 \cdot 10^6$ БУО/мг або в середньому $(77,62 \pm 7,08) \cdot 10^6$ БУО/мг.

В рамках моделі моношарової нелокалізованої адсорбції складна форма ізотерм вірудентного штаму "Пурд"ю-115" пояснюється формуванням агрегатів віріонів на поверхні природного алюмосилікату, що підвищує його сорбційний потенціал порівняно з вакцинним ізолятом "Рімс".

Вплив реакції середовища на інфекційну активність іммобілізованого коронавірусу в культурі клітин СНЕВ.

Важливого значення набувало дослідження зв'язку між ступенем спорідненості вірусу ТГС до активних центрів бентоніту та бляшкоутворюючою здатністю при інокуляції комплексу вірус-сорбент на чутливу клітинну систему. Встановлено, що інфекційна активність модельних вірусів, іммобілізованих при кислих значеннях рН середовища, майже удвічі нижча порівняно з активністю вірусів, сорбованих в лужних умовах. При цьому атенуйований штам виявився більш лабільним до впливу реакції середовища, ніж вірулентний штам коронавірусу ТГС. Так, для референтного вірусу "Пурд"ю-115", сорбованого при значеннях рН 4,50 та рН 7,50 рівень інфекційної активності становив відповідно 17,51% та 49,50% від вихідного значення. Для вакцинного штаму "Римс, іммобілізованого в кислому рН 5,60 та лужному рН 7,70 середовищах бляшкоутворююча здатність дорівнювала відповідно 12,41% та 25,73% від вихідної величини.

Відносно невисокий рівень інфекційної активності іммобілізованого коронавірусу на клітинному моношарі можна пояснити морфологічними та біохімічними особливостями будови вірусу ТГС і, насамперед, наявністю на поверхні віріонів структурних утворень - пепломерів глікопротеїдної природи, які можуть взаємодіяти з активними центрами природного сорбенту. При цьому, ймовірно, блокуються рецепторні ділянки, відповідні за адсорбцію коронавірусу з чутливою клітинною системою, що впливає на його біологічну активність.

Порівняльна оцінка сорбційної активності мінеральних носіїв природного та штучного походження відносно вірусу ТГС.

Останнім часом широкого поширення в медицині та ветери-

нарії набули штучні дисперсні матеріали на основі пірогенного кремнезему - аеросили. Ці речовини, як і бентоніти, відносяться до неорганічних полімерів, так як мають здатність утворювати роагалужену об'ємну структуру (Айлер Р., 1982; А.І.Тенцова, 1985). На відміну від бентонітів, які є природною сировиною, аеросили одержують синтетичним шляхом. Враховуючи поверхневу структуру та хімічний склад алюмоаеросилу, близького до природного мінералу, важливим було оцінити сорбційні властивості цих матеріалів стосовно коронавірусу трансмісивного гастроентериту.

Встановлено, що ізотерми сорбції референтного штаму "Пурд"ю-115" на алюмоаеросилі мають сигмоїдну форму з двома рівнями насичення сорбційних сайтів поверхні носія. На основі застосування моделі ізотерми Хіла-де Бура для апроксимації експериментальних кривих показано, що природні та штучні алюмосилікати істотно відрізняються за своєю функціональною активністю при взаємодії з коронавірусом. Так, величина граничної сорбційної ємності бентоніту значно вища порівняно з алюмоаеросилом і дорівнює відповідно $83,29 \cdot 10^6$ БУО/мг та $55,29 \cdot 10^4$ БУО/мг. При цьому константа сорбційної рівноваги K_1 у синтетичного сорбенту на три порядки перевищує аналогічний показник для природного мінералу і становить відповідно $669,21 \cdot 10^{-6}$ мл/БУО та $0,32 \cdot 10^{-6}$ мл/БУО. Встановлено, що показники константи сорбційної рівноваги K_2 , яка характеризує взаємодію між віріонами в адсорбційному шарі, були одного порядку для бентоніту та алюмоаеросилу (7,28 та 4,64). Це свідчить, можливо, про те, що дисперсійний характер взаємодії між функціональними групами поверхневих вірусних білків мало залежить від природи носія, а відбиває біологічні особливості коронавірусів.

ВИСНОВКИ

1. Вперше на моделі збудника трансмісивного гастроентериту с/линей проведено вивчення особливостей взаємодії складноорганізованих коронавірусів з дисперсними матеріалами природного та синтетичного походження (бентонітом та алюмоаеросилом). Шляхом кінетичного аналізу експериментальних ізотерм дана кількісна оцінка величини максимальної сорбції та ступеню афінитету вірусу ТГС на неорганічних субстратах.

2. При вивченні умов сорбції коронавірусу мінеральними носіями встановлено, що на ефективність іммобілізації впливають такі фактори, як тривалість взаємодії, рН середовища та концентрація сорбенту. Відзначається експоненційний характер залежності величини питомої сорбції вірусу від вмісту носія у дисперсній системі.

3. При порівняльному дослідженні сорбційних властивостей вірулентного та атенуйованого штамів вірусу ТГС встановлено їх суттєві відмінності за характером сорбції на природному алюмосилікаті - бентоніті. Показано, що здатність референтного штаму "Пурд"ю-115" формувати агрегати віріонів на поверхні бентоніту підвищує його сорбційний потенціал порівняно з вакцинним ізолятом "Римс". Так, величина максимальної сорбції для вакцинного штаму становить $(28,69 \pm 3,50) \cdot 10^6$ БУО/мг, а для штаму "Пурд"ю-115" граничний рівень сорбції дорівнює $(77,62 \pm 7,08) \cdot 10^6$ БУО/мг.

4. Встановлено, що максимальна сорбційна ємність бентоніту для модельних штамів є постійною величиною і не залежить від реакції середовища. Показано, що при кислих значеннях рН істотно зростає афінитет коронавірусу до активних

центрів природного сорбенту. Відзначається наявність оберненої залежності між ступенем спорідненості вірусу ТГС та його бляшкоутворюючою здатністю при інокуляції іммобілізованого вірусу на чутливий клітинний моношар.

5. При порівняльній оцінці адгезивних властивостей природного та синтетичного алюмосилікатів відносно коронавірусу ТГС на основі застосування рівняння Хіла-де Бура досліджено, що сорбційна ємність бентоніту значно вища порівняно з пірогенним алюмоаеросилом і дорівнює відповідно $83,29 \cdot 10^6$ БУО/мг та $55,29 \cdot 10^4$ БУО/мг. При цьому ступінь спорідненості коронавірусу до синтетичного сорбенту на три порядки перевищує аналогічний показник для природного мінералу, становлячи відповідно $669,21 \cdot 10^{-6}$ мл/БУО та $0,32 \cdot 10^{-6}$ мл/БУО.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Мойса Л.Н., Бойко И.И., Кучерявенко А.А. Способ получения антигенного препарата вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней // Положительное решение ВНИИГПЭ о выдаче патента РФ от 29.09.94 г., заявка N 5038436/13, А 61 К 39/225.
2. Крикунец В.М., Мойса Л.Н., Малинская С.М., Дубовенко Е.К., Чечельницкая Л.Н. Некоторые симбиотические показатели штаммов NUP^- и NUP^+ *Rhizobium japonicum* в онтогенезе сои и эффективность симбиоза // Физиология и биохимия культурных растений. - 1986. - 18, N3. - С. 253-260.
3. Кучерявенко А.А., Мойса Л.Н., Кучерявенко Ал-й А., Погребняк О.П., Вишнякова Н.Н. Сравнительное изучение чувствительности различных клеточных систем к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней штамма М-42 // Применение биотехнологий в животноводстве, растениеводстве и ветеринарной меди-

щине: Тез. докл. Всесоюз. научно-технич. конференц., Ленинград, 1988. - Москва, 1988. - С.118.

4. Мойса Л.М., Вишнякова Н.М., Кучерявенко О.О., Кучерявенко Ол-й у., Пушко М.П. Вплив рівня пасажу культури клітин ПСП на чутливість до вірусу ТГС штаму "Пурд"ю-115" // Тез. доповід. наук.-теоретичної конференц. - Кам"янець-Подільський 1989.-С. 54-55.

5. Мойса Л.М. Перспективи використання адсорбції коронавірусу свиней на бентоніті в біотехнології // Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку: Тези доповід. І Республіканської наукової конференц. - Львів, 1990.- С. 92.

6. Мойса Л.Н., Бойко И.И., Вишнякова Н.Н., Кучерявенко А.А. Возможности применения природных алюмосиликатов для совершенствования мероприятий по борьбе с коронавирусными гастроэнтеритами свиней // Ветеринарная медицина: экономические, социальные и экологические проблемы. - Харьков, 1990. - С.313.

7. Мойса Л.Н. Изучение адсорбции вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней на бентоните // Энтеровирусы. Общетеоретические и медицинские аспекты: Материалы Всесоюз. конференц. - Киев, 1991.- С. 71.

8. Мойса Л.М., Вишнякова Н.М., Кучерявенко О.О. Залежність репродукційної здатності вірусу ТГС від рівня пасажу на культурі клітин тестикул свиней // XII Український республік. з'їзд мікробіологів, епідеміологів і паразитологів. Харків, 1991. - Київ, 1991. - Ч.І. - С.216.

9. Бойко І.І., Гирін В.М., Дяублик І.В., Мойса Л.М. Чутливість деяких стабільних ліній культур клітин до ентеровірусів при їх виявленні методом бляшок // XII Український республік. з'їзд мікробіологів, епідеміологів і паразитологів.

Харків, 1991. - Київ, 1991. - Ч. I. - С. 187.

10. Мойса Л.Н., Вишнякова Н.Н., Кучерявенко А.А. Исследование сорбционных свойств коронавируса свиней при иммобилизации на бентоните // III Всесоюз. конференц. по эпизоотологии. - Новосибирск, 1991. - С. 239-240.

11. Мойса Л.Н., Бойко И.И. Сравнительная оценка адгезивных свойств некоторых штаммов коронавируса свиней путем математического моделирования // Международ. конференц. по проблемам медицины катастроф. - Киев: АМОК, 1992. - Т. 2. - С. 195-196.

12. Мойса Л.Н. Влияние pH среды на сорбционную активность коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней при иммобилизации на бентоните // Наука и производство - здравоохранению: 5 научно-практическая конференц. - Киев, 1993. - Т. I. - С. 28-29.

Moisa L.N. Sorptive Properties of Porcine Coronavirus Immobilized on Non-organic Polimers.

Dissertation for a degree of Candidate of Biological Sciences, specialization-virology, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Ukraine, Kiev, 1995.

By the model of TGE coronavirus it was established that the efficiency of its immobilization by mineral carriers depends on the time of interaction, pH medium and the sorbent concentration. It was shown that the capability of virulent strain of TGEV to form aggregates on the surface of bentonite raises its sorption potential in comparison with the attenuated strain of TGEV. It was established that the maximum sorption of coronavirus on the natural mineral amounts to $83,29 \cdot 10^6$ PFU/mg and the synthetic alumo-aerosil - $55,29 \cdot 10^4$ PFU/mg.

Мойса Л.Н. Сорбционные свойства коронавируса свиней при иммобилизации на неорганических полимерах.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 - вирусология. Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 1995.

На модели коронавируса ТГС установлено, что эффективность его иммобилизации минеральными носителями зависит от времени взаимодействия, pH среды и концентрации сорбента. Показано, что способность вирулентного штамма формировать агрегаты вирионов на поверхности бентонита повышает его сорбционный потенциал по сравнению с аттенуированным штаммом. Установлено, что предельная сорбция вируса ТГС на природном минерале составляет $83,29 \cdot 10^6$ БОЕ/мг, а на синтетическом алумоаэросиле - $55,29 \cdot 10^4$ БОЕ/мг.

Ключові слова: коронавіруси, вірус трансмісивного гастроентериту свиней, сорбенти, адгезія, іммобілізація.

AB 33.476