

Таблиця 1 – Динаміка ИП кліток перевиваємої лінії MDBK і первичної культури ППК при 5-7 % вмісті CO₂ в інкубаційній середі (n=5)

Показатели	Время культивирования (ч), условия и величины показателей								
	24			48			72		
	контроль	5% CO ₂	7% CO ₂	контроль	5% CO ₂	7% CO ₂	контроль	5% CO ₂	7% CO ₂
ИП ППК	1,2±0,2	1,4±0,1	1,4±0,2	1,9±0,2	1,9±0,2	2,0±0,2	2,0±0,2	2,3±0,2	2,9±0,3*
ИП MDBK	0,9±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2	1,1±0,2	1,5±0,2	1,5±0,2	2,5±0,3	3,5±0,3**	3,4±0,3*

Примечание: * - $p \leq 0,005$, ** - $p \leq 0,001$ по сравнению с контролем

Таблиця 2. – Динаміка розміра кліток перевиваємої лінії MDBK і первичної культури ППК при 5-7 % вмісті CO₂ в інкубаційній середі (n=5)

Показатели	Время культивирования (ч), условия и величины показателей								
	24			48			72		
	контроль	5% CO ₂	7% CO ₂	контроль	5% CO ₂	7% CO ₂	контроль	5% CO ₂	7% CO ₂
Размер клеток ППК	17,5±0,8	16,8±0,5	17,3±0,6	16,0±0,4	16,3±1,0	17,0±0,4	16,4±0,5	17,3±0,4	18,0±0,4
Размер клеток MDBK	16,0±0,4	17,2±0,6	17,0±0,5	16,0±0,6	16,0±0,6	16,0±0,5	16,4±0,5	15,6±0,3	15,4±0,3

Выводы.

1. В условиях *in vitro* клітки перевиваємої лінії MDBK і первичної культури ППК реагували на направленне, фізіологічне збільшення, вмісту двоокиси вуглецю до 5-7 %, в інкубаційній середі закономірним підйомом ИП 15-45 % ($p \leq 0,005$), інтенсивності росту, свідельствующим об участі в механізмах росту і розвитку кліток, стимулюючому их впливі двоокиси вуглецю.

2. Степень реакції кліток перевиваємої лінії MDBK і первичної культури ППК на направленне, фізіологічне збільшення вмісту двоокиси вуглецю в інкубаційній середі неодинакова, вище она у кліток перевиваємої лінії MDBK, нижче у кліток первичної культури ППК, у останньої вище при 7 %, нижче при 5 % вмісті CO₂ в середі інкубації, свідельствующим о специфіці росту і розвитку, механізмів их забезпечення у кліток цих культур.

Список литературы

1. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии): [под общ. ред. Дьяконова Л.П.]-М.: «Спутник+», – 2009. – 656 с.
2. Методы культивирования клеток: [под ред. Пинаев Г.П., Богдановой М.С.]-СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – 278 с.
3. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных РККК (П), (СХЖ РАСХН): каталог / [сост. Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В. и др.]. – Москва: «Эльфа-К», 2006. – 116 с.
4. Carbon dioxide inhalation causes pulmonary inflammation / [Abolhassani M., Guais A., Chaumet-Riffaud P. et al.]. – J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2009. – 665 l.

THE REACTION OF MDBK CELL LINE CELLS AND PRIMARY BOVINE FETAL KIDNEY CELLS TO CARBON DIOXIDE

Khamzina E.Yu., Plotnikova A.M., Gudina V.A.*, Kirillova J.M., Glagoleva I.S.

Federal Centre for Toxicological and Radiobiological Safety of Animals, Kazan,

*Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman

The reaction of the cells of established MDBK line and primary bovine fetal kidney cells to the physiological content (5-7) % of carbon dioxide in the incubating medium was studied.

УДК 619:578:616.98:578.828.11

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІНГІБІТОРУ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГІСТОНІВ НА ЕКСПРЕСІЮ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Шаповалова О.В., Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., Корнєйков О.М., Лиманська О.Ю., Симоненко С.І.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Збудник лейкозу великої рогатої худоби – вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ) належить до родини ретровірусів, особливістю біології яких є здатність персистувати в організмі сприйнятливою хазяїна за рахунок латентної інтеграції провірусу в інфікованих лімфоцитах і пухлинних клітинах. Як відомо, в окремих клітинах ВЛВРХ не експресується у кількості, достатньої для детекції існуючими діагностичними методами. З діагностичною метою активацію транскрипції збудника можна досягти за допомогою культивування лімфоцитів периферичної крові інфікованих тварин *in vitro*. В подальшому вірус виявляється шляхом електронної мікроскопії або індикацією його антигенів у культуральній рідині. Крім того, ДНК провірусу та РНК ВЛВРХ може бути знайдена в клітинах крові або пухлин методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [1].

Під час досліджень ВЛВРХ у короткострокових культурах лейкоцитів периферичної крові тварин використовують стимулятори продукції вірусу – сироватку ембріонів корів, ліпополісахариди, фітогемаглютинін, тощо [2]. Однак, молекулярні механізми дії цих речовин до кінця не вивчені.

Останнім часом багато уваги приділяється дослідженню молекулярно-генетичних механізмів впливу на експресію вірусу. Було встановлено, що одним із шляхів підвищення транскрипції ВЛВРХ може бути застосування деацетилаз гістонів, серед яких вивчали трихостатин А, трапоксин, натрію вальпроат та інші [3].

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

В досліджах *ex vivo*, проведених на короткострокових культурах В-лімфоцитів від овець, інфікованих ВЛВРХ, яких використовували у якості експериментальної моделі інфекції, було показано дію вальпроату натрію як активатора експресії генів вірусу, а також *in vivo* його позитивний вплив на перебіг лейкозу та лімфоми у експериментально інфікованих овець [4].

В доступній літературі ми не знайшли повідомлень про дослідження впливу натрію вальпроату на лейкоцити периферичної крові ВРХ – природнього хазяїна збудника. У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчення впливу інгібітору деацетилаз гістонів натрію вальпроату на експресію вірусу у лейкоцитах хворої на лейкоз великої рогатої худоби.

Матеріали і методи. Для експериментів використовували периферичну кров корови з попередньо встановленим діагнозом лейкозу. Гематологічні показники донора крові складали – загальна кількість лейкоцитів 11,2 тис./мкл, паличкоядерні лейкоцити – 2 %, сегментоядерні – 19 %, моноцити – 4 %, лімфоцити – 75%; антитіла до ВЛВРХ в сироватці крові виявлялися в РІД у титрі 1:8.

Кров брали з яремної вени в стерильні системи, які вміщували 3,8 % розчин цитрату натрію з розрахунку 150 см³ розчину на 1 дм³ крові. З одержаної крові в умовах асептики виділяли лімфоцити на градієнті тріомбразу, щільність якого дорівнювала 1,077.

Отримані лімфоцити двічі відмивали середовищем Ігла шляхом центрифугування при 1500 об/хв. протягом 10 хвилин, визначали їх життєздатність за допомогою фарбування 0,1 % розчином трипанового синього, кількість загальноприйнятним методом підрахунку у камері Горяєва.

Культивування відмитих лімфоцитів проводили за температури 37 °С протягом 72 годин на живильному середовищі, до складу якого входили 90% середовища Ігла, 10 % стерильної інактивованої теплою, нативною, вільної від специфічних антитіл сироватки крові ВРХ, бензилпеніциліну натрієвої солі 100 МО/ см³, стрептоміцину 0,1 мг/ см³. Культивування проводили в 500 см³ флаконах з додаванням натрію вальпроату у кінцевій концентрації 0,5 мМ. Оптимальна концентрація лімфоцитів для культивування становила 2-3x10⁶ клітин/см³. Лімфоцити використовували як контроль, які культивували без додавання препарату, а також некультивовані лімфоцити.

Після культивування клітини знімали повільним коливанням флаконів, осаджували центрифугуванням при 1500 об/хв. протягом 10 хвилин, потім тричі відмивали фосфатно-буферним фізіологічним розчином, рН 7,2 (ФБФР). Після перевірки на життєздатність доводили концентрацію до 10⁶ клітин/см³ ФБФР. Суспензію клітин заморожували за температури –18-20 °С. Дослідження експресії вірусу лейкозу у суспензіях лімфоцитів з вищевказаною концентрацією клітин проводили методом стандартної ПЛР з використанням тест-системи для детекції ДНК провірусу виробництва ННЦ «ІЕКВМ» або методом ПЛР зі зворотною транскрипцією з використанням комерційного набору «Реверта-Л» (Амплісенс, РФ) для детекції геномної РНК ВЛКРС Електрофорез продуктів реакції проводили у 1,5 % гелі агарози, забарвленому етідієм бромистим. Візуалізацію результатів ПЛР здійснювали у проникаючому УФ-світлі.

Результати досліджень. Проведені експерименти показали, що вальпроат натрію у кінцевій концентрації 0,5 мМ не має негативного впливу на життєздатність короткостроково культивованих лімфоцитів, виділених з периферичної крові ВРХ, інфікованої ВЛВРХ. Після культивування з додаванням натрію вальпроату живими залишались 78,33±19,68 % клітин, в контролі – 85,82±12,69 % (P>0,05).

При дослідженні методом ПЛР було знайдено специфічний фрагмент довжиною 241 п.н., який відповідав ділянці провірусної ДНК (геномної РНК) ВЛВРХ. При цьому було встановлено, що інтенсивність флуоресценції одержаних при електрофорезі смуг, які відповідали продуктам реакції, відрізнялась у пробах лімфоцитів, що не культивували та культивували з та без додавання вальпроату натрію (табл.).

Таблиця – Результати дослідження експресії ВЛВРХ у лімфоцитах периферичної крові ВРХ методом ПЛР

№ пп	Матеріал для дослідження	Наявність специфічного фрагмента провірусу ВЛВРХ	Наявність РНК ВЛВРХ	Ступінь інтенсивності реакцій
1	Лімфоцити, культивовані з додаванням натрію вальпроату	+	+	+++
2	Лімфоцити, культивовані без додавання натрію вальпроату	+	+	++
3	Лімфоцити не культивовані	+	+	+

Як свідчать результати, наведені в таблиці 1, на відміну від контрольних проб суспензії лімфоцитів, які піддавали короткостроковому культивуванню, або не піддавали в живильному середовищі, що не вміщувало стимулятора експресії вірусу, у дослідних пробах лімфоцитів, культивованих у присутності 0,5 мМ натрію вальпроату, ступінь інтенсивності прояву реакції була суттєво вищою. Це вказує на підвищення експресії ВЛВРХ у лімфоцитах хворої на лейкоз ВРХ під впливом натрію вальпроату.

Висновки. Інгібітор деацетилаз гістонів натрію вальпроат у концентрації 0,5 мМ при культивуванні протягом 72 годин не знижує життєздатність лімфоцитів та підвищує експресію вірусу в лімфоцитах периферичної крові великої рогатої худоби, інфікованої ВЛВРХ.

Перспективи подальших досліджень. Отримані попередні результати вказують на доцільність проведення випробувань інгібіторів деацетилаз гістонів як стимуляторів продукції ВЛВРХ та його антигенів в культурі клітин, хронічно інфікованих вірусом лейкозу.

Список літератури

1. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 2008. – ch. 2.4.11 Enzootic Bovine Leukosis. – P. 729-738. - <http://www.oie.int>.
2. Donna, M., Transcriptional Activation of Bovine Leukemia Virus in Blood Cells from Experimentally Infected, Asymptomatic Sheep with Latent Infections/ Donna M, Radke L. // Journal of virology. – 1989. – Vol. 63. – No. 5. – P. 2099-2107.
3. Inhibition of Histone Deacetylases Induces Bovine Leukemia Virus Expression In Vitro and In Vivo / C. Merezak Achachi [et al.]// J. of Virol. – 2002. – Vol. 76. – N 10. – P. 5034-5042; Increase of antigen production in BLV-infected cell lines via additional expression of tax / H. J. Wagner [et al.]// Zentralbl Veterinarmed [B]. – 1995. – Vol. 42. – N 9. – P. 543-550.
4. Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo / A. Achachi [et al.]// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005. – Vol. 102. – No. 29. – P. 10309-10314; Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet [et al.]// Retrovirology. – 2007. – Vol. 4, N 18. – 10.1186/1742-4690-4-18. -<http://www.retrovirology.com/content/4/1/18>

STUDIES OF THE HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR EFFECT ON THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS EXPRESSION

Shapovalova O.V., Gorbatenko S.K., Kuznetsova E.V., Korneykov A.N., Limanskaya O.Y., Simonenko S.I.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Histone deacetylase inhibitor sodium valproate effect on bovine leukemia virus expression in peripheral blood lymphocytes from cattle with bovine leukemia has been studied. There was established that the drug in a concentration of 0.5 mM does not reduce the viability of lymphocytes in short-term cultures and causes a threefold increase in virus expression compared to uncultivated cells.