

Список літератури

1. Бусол, В.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / Бусол В.А., Бабкин А.Ф., Жованик П.Н. – К.: Урожай, 1991. – 176 с. 2. Бабкин, А.Ф. Комплемент фіксуючий тест у діагностиці інфекційного епідидиміти баранів [Текст] / Бабкин А.Ф., Медвідь О.О., Райко Д.Ю. // Вет. медицина : Міжвід. темат. наук зб. – Х., 2009. – Вип. 92. – С. 38-42. 3. Дейнеш, А.А., Бабкин, А.Ф. Применение РИД и ИФА при оздоровлении овцеводческих хозяйств от инфекционного эпидидимита баранов. // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и совершенствование мер борьбы с болезнями в условиях интенсивного ведения животноводства и создания фермерских хозяйств: Тез. докл. Всесоюз. конф. 17-22 сентября 1991 г. – Харьков, 1991. – с. 115. 4. Комісійні випробування нової технології комплемент фіксуючого тесту для виявлення антитіл проти збудників інфекційних хвороб. [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // Вет. медицина : Міжвід. темат. наук зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 221-224. 5. Chapter 2.4.1 [Text] // OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees).- 5th ed. – Paris, 2004. – Vol. 1.- P. 245-250. 6. Chapter 2.4.1 [Text] // OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees).- 6th ed. – Paris, 2004. – Vol. 1. – P. 257-263. 7. Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. / Marin C.M., Alonso-Urmeneta B., Morlion J., Perez S.L., Blasco J.M. // Vet. Rec. 1998, V. 143, P. 390-394. 8. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. / Marin C.M., Jimenes Z de Bagues U.P., Blasco J.M., Yamazo C., Moriyon J. and Diaz R. // Vet. Rec. 1989, V. 125, P. 504-508. 9. Comparison of an enzyme linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. / Ris D.R., Hamel K.L. and Long D.J. // Vet. J. 1984, V. 32, P. 18-20. 10. Test can help improve range ram fertility // New Zealand veterinary journal 1987, – №35(6), P. 25-26. 11. Searson J.E. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams // Austr. Veterinary journal 1982, V.58 – P. 67.

RESEARCH OF IMMUNOSORPTION OF THERMOSTABLE AND THERMOLABILE ANTIGENS OF THE STRAINS *B. OVIS* 67/B, 76/982, 156/7807 AND SPECIFIC BRUCELLA OVIS PEROXIDASE CONJUGATE IN ELISA**Babkin A.F., Mikhailova S.A., Obukhovska O.V., Blyznetsov A.G., Goncharenko-Prokof'yeva V.V.***National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv*

*Preliminary results of study of sorption activity of salt thermo extracted (thermostable) and thermolabile antigens bacterial suspensions of three industrial strains *B. ovis* in standard polystyrene plates of the company «Nunc MaxiSorp», are presented in the paper. Indication of adsorbed antigens was carried out with peroxidase conjugate gammaglobulin G made from positive blood of sheep, infected with the strain *B. ovis* 67/B serum.*

УДК 619:616.98:578

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, К ВИРУСАМ *IN VITRO***Викторова Е.В., Шуляк А.Ф., Гулюкин М.И., Савченкова И.П.***ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко, г. Москва*

Проведение фундаментальных медико-биологических исследований, связанных с безопасностью как животных, так и человека, а также производство вакцин, антигенов, диагностических препаратов, репродукция существующих и выделение новых штаммов вирусов, осуществление вирусологических и иммунологических исследований связано с культивированием вирусов *in vitro* в чувствительных биологических объектах. Отсутствие адекватных клеточных систем существенно сдерживает исследования в данном направлении. В связи с этим неизменно существует острая необходимость в разработке эффективных клеточных систем и изучении развития в них инфекционных процессов. Мезенхимные створовые клетки мультипотентны и могут дифференцироваться в нескольких направлениях в пределах тканевых производных одного зародышевого листка. Легкость выделения и доступность биологического материала (подкожный жир, костный мозг, кожа) делает их перспективным материалом для изучения инфекций животных и человека. Направленная дифференцировка мультипотентных мезенхимных створовых клеток (ММСК) *in vitro* позволяет создавать новые уникальные клеточные системы для проведения сравнительного анализа динамики развития вирусной инфекции в створовых клетках различного происхождения, а также в процессе их дифференцировки в разные типы клеток [1]. Использование ММСК в качестве клеточной модели особенно перспективно для проведения фундаментальных исследований, связанных с изучением механизмов взаимодействия вируса и клетки-хозяина. Такие исследования являются ключевыми для понимания сложных процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровнях, и позволяют получить новые данные о роли факторов, рецепторов, генов, ответственных как за связывание, так и за блокирование этого взаимодействия. Появились первые работы в этом направлении [2; 3].

Целью настоящего исследования было оценить чувствительность ММСК, выделенных из жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ) крупного рогатого скота (КРС), к ДНК- и РНК-содержащим вирусам различных видов животных.

Материалы и методы. Клеточные культуры. В экспериментах использовали сыворотку плодов коров фирмы Cibus (США), свободную от контаминации вирусами ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и от соответствующих антител.

В качестве клеточной модели были использованы ММСК, выделенные из жировой ткани и костного мозга КРС по методике, разработанной нами ранее [4]. Экспрессию коллагена 1-го типа в ММСК определяли посредством измерения уровня матричной РНК (мРНК) методом ПЦР в реальном времени (ПЦРРВ). Дифференцировку ММСК в клетки костной и жировой тканей проводили по методике, описанной нами ранее [4, 5]. Спустя 21 сутки после начала индукции клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 5-6 минут и окрашивали по von Kossa, алizarиновым красным S и жирным красным O. **Вирусы.** В экспериментах использовали штаммы вирусов, хранившиеся в лиофилизированном состоянии в музее отдела вирусологии ВИЭВ им. Я.П. Коваленко: референтные штаммы «К-40» вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС, «Орегон» вируса диареи – болезни слизистых оболочек (ВД-БС), «Мовар» вируса герпеса КРС типа 4, энцефаломиокардита мышей (ЕМС), производственные вакцинные штаммы «ВК-1» ВД-БС, «ПТК 45/86» вируса парагриппа-3 (ПГ-3), «СВ/69» вируса ринопневмонии лошадей (РПЛ) и штамм вируса ИРТ, выделенный из вакцины Bovilis IBR-marker «Интервет». Все штаммы обладали типичной для своего вида морфологией и антигенной структурой. До лиофилизации вирусы культивировали только в первичных культурах или в их субкультурах.

Инфицирование культур клеток. Вирусы инокулировали в культуру ММСК непосредственно после растворения лиофилизата. Множественность заражения (МЗ) в первом пассаже не учитывали. При дальнейшем пассировании МЗ составляла 0,1 ТЦД₅₀ на клетку. Инокулум оставляли на 1 час для адсорбции вируса на клетках, затем его удаляли и культуру промывали поддерживающей средой. После внесения поддерживающей среды в объеме, составляющем 10 % от емкости культурального флакона, культуру помещали в СО₂-инкубатор с 5 % СО₂ при температуре 37 °С. Репродукцию вирусов учитывали по ЦПД. В качестве контроля использовали неинфицированные ММСК (рис. 1 б, г). Для сравнения в эксперимент были включены зараженные и интактные культуры клеток (СПТ, СПЭВ, МДВК, ФЭЧ), которые традиционно применяются для культивирования включенных в опыт вирусов. Эти культуры использовали для титрования вирусов общепринятым методом.

Результаты и обсуждение. Ранее нами из костного мозга и жировой ткани КРС были выделены клетки с характеристиками ММСК [6]. В этих клетках был выявлен продукт экспрессии гена коллагена 1-го типа. Клетки обладали потенциями к направленной дифференцировке и при индукции формировали клетки костной и жировой тканей *in vitro*. Представляло интерес оценить чувствительность полученных ММСК КРС к вирусам. В результате проведенных исследований было установлено, что вирус ИРТ репродуцировался в культуре ММСК, выделенной как из ЖТ, так и из КМ, с первого пассажа. В культурах наблюдали характерный цитопатический эффект: округление и увеличение отдельных клеток, формирование цитоагломератов, отслоение клеток от культуральной поверхности и образование пустот в монослое (рис. 1 а). Первые признаки ЦПД появлялись через 48-72 ч, а затем нарастали, и полная дегенерация монослоя происходила через 4-5 суток после инфицирования. В инфицированной культуре клеток МДБК этот процесс занимал на 1-2 суток меньше. В первых пассажах модифицированный вакцинный штамм ИРТ заметно быстрее поражал клетки, по сравнению с патогенным «К-40», но к 4-му пассажу это различие исчезло. В процессе пассирования сроки проявления ЦПД уменьшались и на 4-м пассаже были сравнимы с наблюдаемыми в инфицированной контрольной культуре МДБК. Отличался и характер ЦПД в ММСК по сравнению с культурой клеток МДБК. Это отличие заключалось в формировании большого количества очень крупных клеток с нарушенным светопреломлением, с небольшим количеством цитоагломератов («гроздье» клеток).

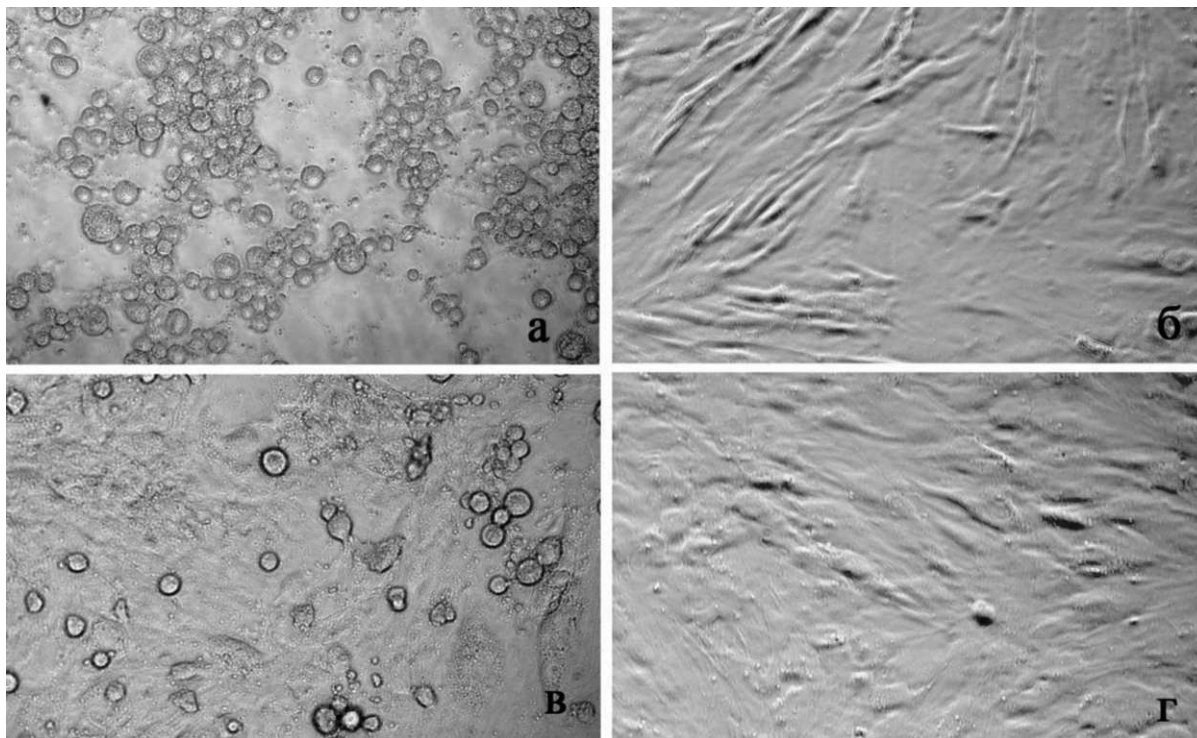


Рис. 1: а – ММСК, выделенные из КМ КРС, зараженные вирусом ИРТ КРС, б – ММСК КМ КРС (контроль), в – ММСК, выделенные из ЖТ КРС, инфицированные РПЛ, г – ММСК ЖТ КРС (контроль). Нативные препараты. Ув.: а, б, в, г – ок: x10, об: x20.

Вирус РПЛ репродуцировался в культуре ММСК, выделенных из ЖТ и КМ, также с первого пассажа. Признаки ЦПД наблюдали через 24 ч. после инфицирования, а через 3-4 суток - полную дегенерацию культуры. Динамика инфекционного процесса была сравнима с наблюдаемой в контрольной культуре клеток СПЭВ. ЦПД характеризовалось появлением по всему полю увеличенных округленных клеток, количество которых со временем нарастало, отдельных синцитиальных образований, отслоением клеток от культуральной поверхности (рис. 1. в.). С 3-го пассажа скорость развития ЦПД замедлялась и полного поражения культуры не наблюдали.

Вирус герпеса КРС типа 4 размножался в экспериментальных ММСК с проявлением типичного ЦПД: появление отдельных округленных клеток на 3-4 сутки, количество которых со временем нарастало. При этом сохранялось значительное число внешне не измененных клеток в течение всего периода наблюдения (20 суток). В процессе пассирования эта картина сохранялась, что согласуется с данными, полученными другими авторами [2].

Культивирование вируса ВД-БС, представленного в наших экспериментах двумя штаммами, сопровождалось развитием ЦПД. Характерными признаками являлось очаговое округление и пикноз клеток, нарастание количества и площади подобных очагов, отслоение клеток от культуральной поверхности. В отличие от контрольной инфицированной культуры (СПТ), ЦПД проявлялось раньше (через 48 и 72 ч., соответственно), но завершалось разрушением монослоя одновременно (через 5-6 сут после заражения). Штаммовых различий в культивировании не обнаружено.

Вирус ЕМС репродуцировался в ММСК, выделенных как из ЖТ, так и КМ, вызывая ЦПД в первых пассажах через 24 ч. после инфицирования, а через 48 ч. полностью разрушал монослой. Изменения клеток заключались в появлении большого числа округлых, неправильной формы отдельных клеток, пикноза, образования клеточного дебриса и отслоения клеток от поверхности культурального флакона. Характер ЦПД вируса ЕМС в ММСК был вполне сопоставим с динамикой инфицирования контрольной культуры ФЭЧ. В процессе пассирования в ММСК скорость инфекционного процесса замедлялась. Репродукции вируса ПГ-3 в культуре ММСК не была выявлена.

Таким образом установлено, что ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, обеспечивают репродукцию как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, относящихся к различным семействам и выделенным от разных видов животных. Установлено, что в процессе пассирования повышается чувствительность ММСК к вирусу ИРТ, но снижается к вирусам РПЛ и ЕМС. Возможно, что наблюдаемое снижение чувствительности к этим вирусам связано со спонтанной дифференцировкой ММСК и накоплением матрикса во время длительного культивирования. Решение этого вопроса связано с дальнейшими исследованиями авторов.

Список литературы

1. Савченкова, И.П. Перспективы использования стволовых клеток в ветеринарии / И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин // Ветеринария. - 2011. - № 7. - с.3-5. 2. Donofrio, G. Susceptibility of bovine mesenchymal stem cells to bovine herpesvirus 4. / S. Colleoni, C. Galli, G. Lazzari, S. Cavirani, C.F. Flammini // J Virol Methods. - 2005. -V. 127. - N.2. - P. 168-170. 3. Donofrio, G. Swine adipose stromal cells loaded with recombinant bovine herpesvirus 4 virions expressing a foreign antigen induce potent humoral immune responses in pigs / S. Taddei, V. Franceschi, A. Capocéfalo, S. Cavirani, N. Martinelli, S. Ottonello, M. Ferrari // Vaccine. - 2011. - V. 29. - N.5. - P. 867-872. 4. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков / И.П. Савченкова, Л.К. Эрнст, М.И. Гулюкин, Е.В. Викторова // М.: Спутник + - 2010. - 23с. - ISBN 978-5-99730926-8. 5. Savchenkova, I.P. Osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells isolated from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue / I.P. Savchenkova, M.S. Rostovskaya, N.I. Chupikova, S.Z. Sharifulina, A.S. Terpyashin // Cell and Tissue Biology. - 2008. - V. 2. - № 6. - P. 556-571. 6. Волкова, И.М Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота / Е.В. Викторова, И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин //Сельскохозяйственная биология. - 2012.- № 2. в печати.

SUSCEPTIBILITY OF BOVINE MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM CATTLE BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE TO VIRUSES IN VITRO

Viktorova E.V., Shulyak A. Ph., Gulyukin M.I., Savchenkova I.P.

All-Russian State Research Institute of Experimental Veterinary named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Cellular populations with characteristics of multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) were isolated from bovine bone marrow (BM) and adipose tissue (AT). Susceptibility of derived MMSCs to DNA - and RNA-containing viruses of various types of animals was studied.

УДК 619:616.98:578.842.1.

РОЗРОБКА ВИДОСПЕЦИФІЧНИХ ПРОМОТОРНИХ КАСЕТ ДЛЯ КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ ВІРУСІВ ТВАРИН

Герілович А.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Розвиток сучасних біотехнологій засобів захисту тварин дедалі більшої уваги надає розробці, впровадженню та удосконаленню методологій, пов'язаних із застосуванням рекомбінантних ДНК. Стаття присвячується розробці промоторних видоспецифічних касетних векторів придатних для отримання експресуючих векторів для прокариотичних та еукариотичних систем. Робота виконана з використанням біоінформатичних методів. Розраховані праймерні системи для отримання видоспецифічних промоторних ділянок генів ВРХ, свиней та птиці, та моделі векторних ДНК.

Одержані результати будуть використані для одержання векторних конструкцій.

Сучасний ринок біологічних препаратів характеризується значним збільшенням питомої ваги продуктів молекулярних біотехнологій. Основні обсяги молекулярно-біотехнологічних досліджень проводяться з метою створення та впровадження діагностичних і профілактичних засобів, призначених для гуманної медицини, у той час, як у сфері ветеринарної медицини цей науковий напрямок у країнах СНД лише започатковується [1, 2, 3, 4].

На сьогоднішній день запропоновано досить велику кількість біотехнологічно значущих систем експресії протеїнів для клітин людини та криси, однак, враховуючи їх видоспецифічність, ефективність цих конструкцій при застосуванні у клітинах тварин є незадовільною [5].

Для експресії в культурах клітин найчастіше використовують промоторні ділянки вірусів [6, 7], однак ці ділянки не зовсім зручні для використання, оскільки вірусні промотори інгібуються під дією α - та γ -інтерферонів [8]. Альтернативою використання вірусних промоторів є промоторні ділянки інтерферонів, які використовуються японськими фахівцями [9].

У ННЦ «ІЕКВМ» впродовж 2006-2010 рр. виконаний цикл досліджень з конструювання рекомбінантних конструкцій на основі видоспецифічних промоторів гена інтерферону курки, що стали основою для створення моно- та бікомпонентних векторних систем на основі генів вірусу хвороби Марека, експресуюча і протективна ефективність яких була доведена експериментально. У порівнянні з даними американських науковців [10, 11] зразки розробленої кандидат-вакцини завдяки згаданим промоторним областям проявили на 5-10 % вищу імуногенність у контрольному зараженні.

У зв'язку з викладеним існує необхідність у розширенні спектру експериментальних робіт щодо формування принципів та розробки молекулярних біотехнологій виробництва рекомбінантних білків та ДНК для розробки засобів захисту тварин. Тому **метою нашої роботи** було створення моделей видоспецифічних експресуючих векторних молекул.

Матеріали і методи. Для проведення досліджень з міжнародних баз даних GenBank та DDBJ завантажували нуклеотидні послідовності перспективних видоспецифічних промоторних ділянок генів цитокінів та інших генів ВРХ, свиней та курей.

Нуклеотидні послідовності аналізували за допомогою біоінформатичного програмного забезпечення щодо розташування старт-кодонів та місць ініціації реплікації інформаційної РНК (іРНК). Грунтуючись на отриманих даних були обрані перспективні ділянки для інтеграції у векторні системи. Їх аналізували щодо наявності сайтів впізнавання ендонуклеазами рестрикції з метою визначення можливості конструювання векторних ДНК на їх основі найбільш поширених полілінкерних систем. Окрім того, визначали структуру їх консервативних та варіабельних мотивів, прогнозовані ймовірні мутаційні зміни. Обрані для клонування цільові ділянки перевіряли щодо видоспецифічності відповідності та ймовірної спорідненості з близькими філогенетично видами. Ці маніпуляції проводили за допомогою *in-silico* програм та алгоритмів множинних вирівнювань.

Обрані перспективні області з рестрикційною толерантністю, високою специфічністю, значним експресуючим потенціалом були застосовані для обчислення праймерних послідовностей для їх клонування у полілінкерні сайти експресуючих плазмідних векторних систем.

Конструювання систем праймерів для клонування перспективних промоторних ділянок ВРХ, свиней та курей.

На основі отриманих на попередньому етапі даних провели дизайн праймерів для клонування із залученням спеціалізованого програмного забезпечення (AmplifyX, BioEdit). При цьому цільові промоторні послідовності були вирівняні за допомогою ClustalW-модуля. Виявлені