

14. Uporov, A.V., Semihlazov, V.F., & Pozharis, K.M. (2000). Immunohistokhymicheskoe vyvchennya klityn raku molochnoyi zalozy z vykorystannyam riznykh markeriv proliferatsiyi [Immunohistochemical study of breast cancer cells using a variety of proliferation markers]. *Arkh patolohiyi – Arch. of pathology.*, 2, 26-30 [in Russian].
15. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., & Schmidt, E.V. et al (1989). Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(1), 297-301.
16. Grin', V.K., Basov, O.I., & Vatutin, M.F. (2012). Pol' sistemi matriksnikh metaloproteinaz ta ikh tkaninnikh ingibitoriv u formuvanni postinfarktnogo remodelyuvannya sertsya (analitichniy oglyad literaturi) [Role system of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the formation of postinfarction cardiac remodeling (analytical literature review)]. *Bukovins'kiy medichniy visnik – Bukovina medical journal*, 16; 2(62), 152-155 [in Ukrainian].
17. Krause, D.S., Fackler, M.J., & Civin, C.I. et al (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87 (1), 1-13.
18. Hammarström, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer. Biol.*, 9, 67-81.
19. Zhang, G., Liu, T., & Chen, Y.H. et al. (2009). Tissue specific cytotoxicity of colon cancer cells mediated by nanoparticle-delivered suicide gene in vitro and in vivo. *Clin. Cancer. Res.*, 15 (1), 201-207.
20. Blumenthal, R.D., Hansen, H.J., & Goldenberg, D.M. (2005). Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 Carcinoembryonic Antigen. *Cancer. Res.*, 65 (19), 8809-8817.
21. Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 169 (5), 1747-1756.
22. Münz, M., Kieu, C., & Mack, B. et al (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, 23 (24) 5748-5758.
23. Chang, L., & Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5 (8), 601-613.
24. Moll, R., Franke, W.W., & Schiller, D.L. et al (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured. *Cell*, 31 (1), 11-24.
25. Filatov, V.L., Katrukha, A.G., & Bereznikova, A.V. et al (1998). Epitope mapping of anti-troponin I monoclonal antibodies. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45 (6), 1179-1187.

УДК 636.09:579.62:579.88:001.891:577.213

КУДРЯВЧЕНКО О.П., канд. вет. наук, e-mail:

kudryavchenko@biocontrol.com.ua

РОМАНЕНКО О.А., канд. вет. наук, e-mail: romanenko.oleg15@gmail.com

ПУСТОВІТ Н.А., e-mail: nadiapustovit@gmail.com.

РОМАНИШИНА Ю.Р., e-mail: yuliaromanyshyna@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

КУЛЬТИВУВАННЯ ЗБУДНИКА *TOXOPLASMA GONDII* В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

*В статті наведені результати визначення динаміки змін кількості тахізоїтів *Toxoplasma gondii* за різних умов зараження перещеплювальних ліній культур клітин Vero,*

HeLa та CrFK. Для підтримання життєздатності й накопичення паразитів у лабораторних умовах, а також виготовлення позитивного контролю для полімеразної ланцюгової реакції підібрали оптимальну клітинну культуру продуцента тахізоїтів *Toxoplasma gondii* й умови культивування. Поширення токсоплазм робить їх досить небезпечними для тварин і людини і, в першу чергу, за наявності в них трьох патогенних форм розвитку (тахізоїти, брандізоїти, ооцисти). Встановлено, що використання перещеплювальних ліній культур клітин у стадії активного росту, як продуценту, дозволяє за 120 год збільшити концентрацію тахізоїтів *Toxoplasma gondii* у 50 разів, що дає можливість підтримувати життєздатність збудника токсоплазмозу в лабораторних умовах.

Ключові слова: діагностика, тахізоїти, токсоплазмоз, культура клітин, ооцисти.

Вступ. Питання токсоплазмозу тварин і людини залишається досить актуальним для ветеринарної та медичної науки і практики України й світу [1]. Оскільки це обумовлено значним його поширенням; обмеженістю методів дослідження, які підтверджують наявність в організмі тварин і людини збудника й характерними клінічними ознаками; неможливістю повної санації організму за допомогою відомих нині засобів та схем лікування, а також відсутністю в окремих фахівців розуміння своєрідності патогенезу цієї патології, особливостей діагностичних і лікувальних підходів.

Значне поширення токсоплазм робить їх досить небезпечними для тварин і людини, що обумовлюється наявністю в них трьох патогенних форм розвитку (тахізоїти, брандізоїти, ооцисти); їхньою стійкістю до несприятливих умов навколишнього середовища; відсутністю специфічності; високою інвазійністю та репродуктивністю і різноманітним шляхів зараження. Це підтверджується тим, що близько 350 видів хребетних є проміжними хазяями токсоплазм [2]. Крім того, токсоплазми мають і певне соціальне значення, оскільки велика кількість котів, що знаходяться безпосередньо біля людей, створюють серйозну небезпеку для здоров'я останніх і особливо, для дітей та вагітних жінок.

Нехарактерні клінічні прояви токсоплазмозу і переважання латентного перебігу над клінічно вираженим, унеможлиблюють постановку діагнозу. У зв'язку з цим, зростає роль лабораторних досліджень, які включають паразитологічні, серологічні та молекулярні методи. Слід відмітити, що в практиці існує більше 20 методів дослідження, але жоден з них ще не задовольнив фахівців повністю [3].

Паразитологічні методи досліджень включають виявлення тахізоїтів і брандізоїтів із патологічного матеріалу методом світлової мікроскопії і виділення ооцист *Toxoplasma gondii* з фекалій у дефінітивних хазяїв. Так метод прямої мікроскопії, хоча нескладний і доступний, проте не завжди результативний. Оскільки виділення ендозоїтів токсоплазм не користується широкою популярністю через велику трудомісткість та необхідності дотримання режимних умов у разі роботи з живим збудником. Тому, в більшості випадків для діагностики токсоплазмозоносійства у тварин, орієнтуються на результати серологічних досліджень.

Для діагностики токсоплазмозоносійства у тварин широко використовують серологічні методи дослідження сироватки крові: реакцію

зв'язування комплементу, флуоресціюючих антитіл й інші, як наприклад, копропротозооскопічні, а останнім часом – полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) [4]. У той же час практична цінність цих методів не однакова. Тому, необхідно мати високочутливий, специфічний і простий за технікою виконання метод лабораторної діагностики, який в однаковій мірі був би прийнятний для лабораторій ветеринарної медицини [5].

Токсоплазми, як і інші організми, можна культивувати, використовуючи методи інокуляції культур клітин або мишей. За даними окремих авторів, у тахізоїтів немає відмінностей в культивуванні *in vivo* або *in vitro*.

Проте, результати вирощування в умовах *in vivo* часто затримуються, оскільки паразити в стадії ооцист не можуть бути ідентифіковані, принаймні до 30 діб після інокуляції. На противагу цьому, результати в культурі клітин можуть бути виявлені протягом двох діб після інокуляції. Крім того, клітинні культури мають ряд переваг порівняно з методом *in vivo*, а саме низька вартість і менше затрат часу.

Мета роботи. Підтримання життєздатності і накопичення тахізоїтів *Toxoplasma gondii* у лабораторних умовах та виготовлення позитивного контролю для полімеразно-ланцюгової реакції.

Матеріали і методи досліджень. Для підтримання життєздатності та накопичення паразитів в лабораторних умовах і виготовлення позитивного контролю для полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) проводили підбір оптимальної культури клітин продуцента тахізоїтів *Toxoplasma gondii* та умов культивування.

З кріосховища клітинних культур відібрали наступні перещеплювані лінії культур клітин: «Vero» – нирки африканської зеленої мавпи, як однієї із найбільш технологічних перещеплюваних ліній, «HeLa» – раку шийки матки людини, як проміжного хазяїна, та нирки kota «CrFK», як дефінітивного хазяїна *Toxoplasma gondii* у стадії активного росту. Після розмороження культур клітин провели три пасажі з інтервалом 3–4 доби для відновлення їх властивостей.

Для отримання інокулянту позитивні зразки від котів (фекалії) з виявленими ооцистами *Toxoplasma gondii* змішували з водою до напіврідкої консистенції, а потім центрифугували 3–5 хв за 1000 об/хв. Потім рідину з пробірки зливали, а до осаду додавали гліцерин навпіл із насиченим розчином натрію хлориду. Осад розмішували і центрифугували 3–5 хв за 1000 об/хв., після чого відбирали по 1 см³ верхнього шару рідини. Усунення бактеріального забруднення отриманих проб проводили шляхом додавання антибіотиків пеніциліну – 1000 ОД та стрептоміцину 200–500 мкг і витримували 1 год у термостаті за температури 37°C. Всього підготували 7 проб для наступних досліджень. Підтвердження відсутності контамінації бактеріальною мікрофлорою проводили за ДСТУ 4483-2003.

Кількість тахізоїтів підраховували за допомогою камери Горяєва. Для інокуляції до середовища ДМЕМ додавали токсоплазми – 1000 екз/см³.

Для отримання моношарів культур клітин у спеціальні ємності з ростовою площею 25 см² вносили по 10 см³ суспензії клітинних ліній із

концентрацією 10^5 клітин в 1 см^3 . На кожну лінію використали по 21 культуральному посуду. Ємності поміщали у вологу камеру CO_2 -інкубатора за температури 37°C . За допомогою інвертованого світлового мікроскопа спостерігали за ступенем формування моношару. Через 6–8 год відмічали формування моношару на 50%, 12–14 год – на 75%, 24–36 год – на 100%. Після чого відбирали по 7 культуральних флаконів із моношаром, сформованим на 50%, 75 та 100%, видаляли ростове середовище і вносили по 1 см^3 попередньо підготовлених зразків для зараження та поміщали у вологу камеру CO_2 -інкубатора за температури 37°C на 1 год для контакту. Після завершення, залишки інокулянта видаляли, а до ємностей додавали по 10 см^3 поживного середовища для культур клітин. Ємності поміщали у вологу камеру CO_2 -інкубатора за температури 37°C та культивували 120 год. На 48, 72, 96 та 120 год після зараження, з культуральних ємностей відбирали зразки культуральної рідини після струшування флакона та визначали кількість тахізоїтів *Toxoplasma gondii* за допомогою камери Горяєва.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати досліджень вказували, що всі лінії перещеплюваних культур клітин (Vero, HeLa та CrFK) чутливі до зараження збудником токсоплазмозу (рис. 1–3).

На рисунках 1–3 відображено динаміку зміни кількості тахізоїтів *Toxoplasma gondii* за різних умов зараження перещеплювальних ліній культур клітин. Встановлено, що за формування моношару на 50 % накопичення тахізоїтів було значно більшим у Vero – 47600 ± 2579 , HeLa – 45700 ± 2579 , CrFK – 50500 ± 2355 , ніж за 100 % у Vero – 9986 ± 887 , HeLa – 7986 ± 887 , CrFK – 9600 ± 815 . Це свідчить про перевагу інвазування культур клітин у стадії активного росту (50% формування моношару).

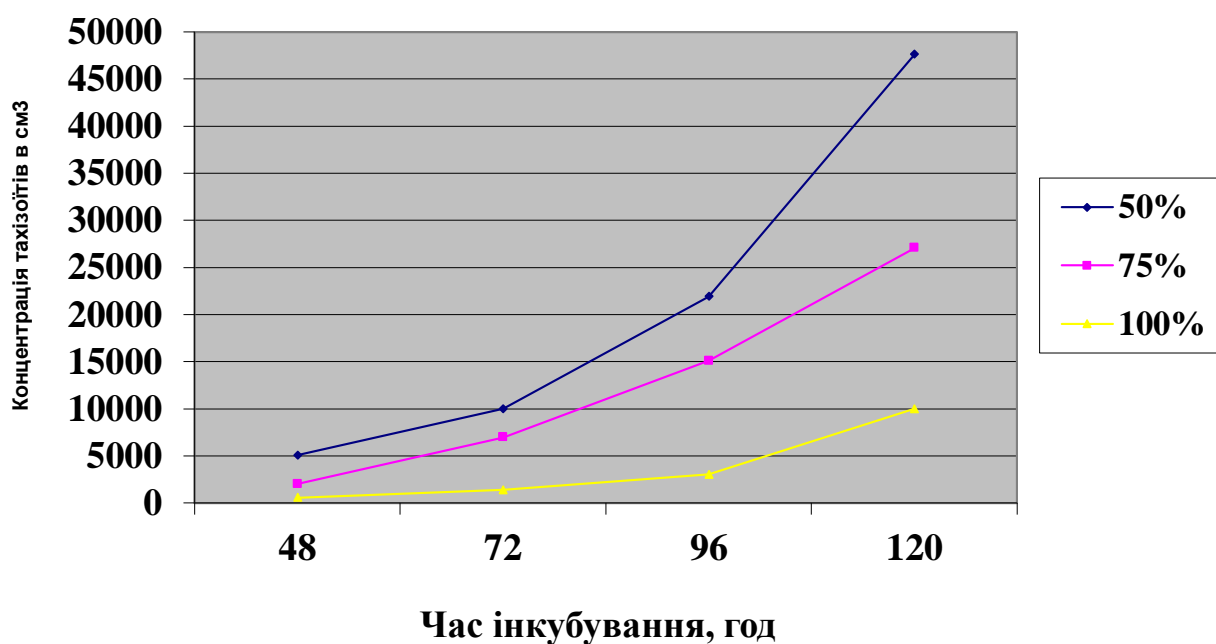


Рис. 1. Динаміка змін кількості тахізоїтів *Toxoplasma gondii* в культурі клітин «Vero».

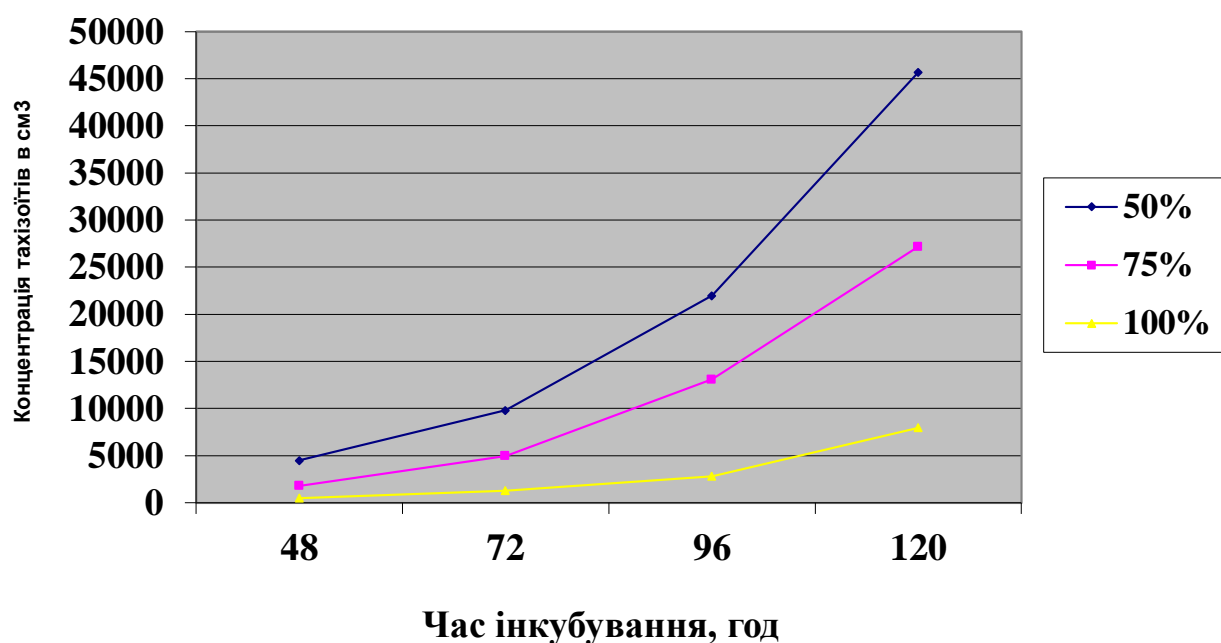


Рис. 2. Динаміка змін кількості тахізоїтів *Toxoplasma gondii* в культурі клітин «HeLa».

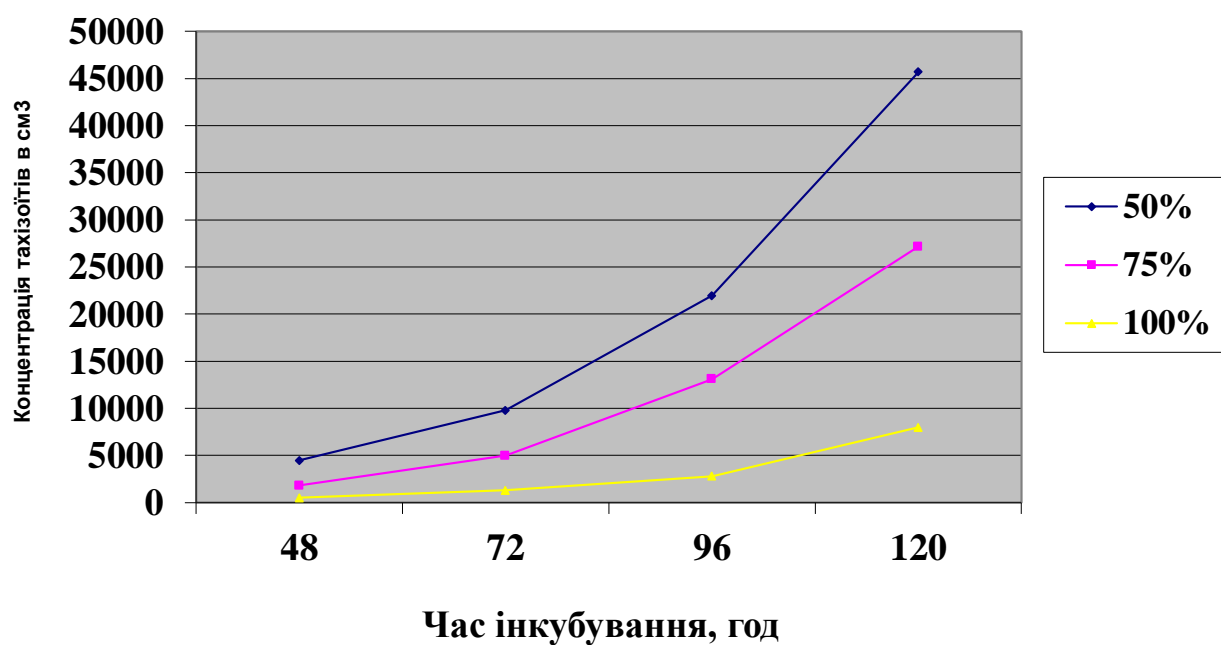


Рис. 3. Динаміка змін кількості тахізоїтів *Toxoplasma gondii* в культурі клітин CrFK.

Отримані результати свідчать, що використання перещеплювальних ліній культур клітин у стадії активного росту, як продуценту, дозволяє за 120 год збільшити концентрацію тахізоїтів *Toxoplasma gondii* у 50 разів.

Отже, цінність методу полягає у його можливості підтримувати життєздатність збудника токсоплазмозу в лабораторних умовах.

Відповідно, накопичення біомаси сприяє створенню компонентів для нових діагностичних тест-систем.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Використання перещеплювальних ліній культур клітин (Vero, CrFK, HeLa) у стадії активного росту, дозволяє за 120 год збільшити концентрацію тахізоїтів *Toxoplasma gondii* у 50 разів.

У поширенні токсоплазмозу значну роль відіграють коти – дефінітивні хазяїни збудника, які розповсюджують ооцисти, що виділяються з фекаліями, забруднюючи навколишнє середовище, і є об'єктами високого ризику зараження людини, тому вивчення проблеми токсоплазмозу потребує на необхідність її подальшого моніторингу в Україні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аксман А. Приобретенный токсоплазмоз с поражением центральной нервной системы / А. Аксман // Медицинская паразитология. – 1985. – № 5. – С. 18–21.
2. Акбаев М.Ш. Паразитология и инвазионные болезни животных / М.Ш. Акбаев. – М., 1998. – С. 68–73.
3. Паразитологія та інвазійні хвороби тварин / В.Ф. Галат, А.В. Березовський, М.П. Прус, Н.М. Сорока. – Київ: Вища освіта, 2003. – 434 с.
4. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem) / T.V. Beyer, N. V. Svezhova, A.I. Radchenko, N.V. Sidorenko // Cell Biology International. – 2002. – № 26. – P. 861–871.
5. Dubey J. P. History of the Discovery of the Life Cycle of *Toxoplasma gondii* / J.P. Dubey // International Journal for Parasitology. – 2009. – Vol. 39. – P. 877–882.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ *TOXOPLASMA GONDII* В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК / Кудрявченко А.П., Романенко О.А., Пустовит Н.А., Романишина Ю.Р.

В статье приведены результаты определения динамики изменений количества тахизоитов *Toxoplasma gondii* при разных условиях заражения перевиваемых линий культур клеток Vero, HeLa и CrFK. Для поддержания жизнеспособности и накопление паразитов в лабораторных условиях, а также изготовление положительного контроля для полимеразной цепной реакции подобрали оптимальную клеточную культуру продуцента тахизоитов *Toxoplasma gondii* и условия культивирования. Распространение токсоплазм делает их достаточно опасными для животных и человека и, в первую очередь, при наличии в них трех патогенных форм развития (тахизоиты, брадизоиты, ооцисты). Установлено, что использование перевиваемых линий культур клеток в стадии активного роста, как продуцента, позволяет за 120 ч увеличить концентрацию тахизоитов *Toxoplasma gondii* в 50 раз, что дает возможность поддерживать жизнеспособность возбудителя токсоплазмоза в лабораторных условиях.

Ключевые слова: диагностика, тахизоиты, токсоплазмоз, культура клеток, ооцисты.

CULTIVATION OF *TOXOPLASMA GONDII* IN CELL CULTURE / Kudryavchenko A.P., Romanenko O.A., Pustovit N. A., Romanyshyna Y.R.

Introduction. Spread of *Toxoplasma* makes this pathogen quite dangerous for animals and humans because of the three forms of pathogens (tachyzoites, bradizoites, oocysts).

The goals of the work were to maintain vitality, accumulate *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro and create a positive control for polymerase chain reaction.

Materials and methods. The cell lines Vero, CrFK, HeLa for *Toxoplasma gondii* cultivation were used.

Results of research and discussion. It was established that cell lines usage as producers in a stage of rapid growth, allows to increase the concentration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in 50 times for 120 hours, which makes it possible to maintain the viability of toxoplasmosis pathogen in the laboratory.

Conclusions and perspectives for further research. The use of Vero, CrFK, HeLa cell lines in a stage of rapid growth, allows increasing the concentration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in 50 times for 120 hours.

The value of the method of cultivation is its ability to maintain the viability of toxoplasmosis pathogen in the laboratory conditions.

Significant role in toxoplasmosis spreading is played by cats. They are the definitive host of the pathogen that distribute oocysts with the feces, contaminate the environment and are the subject of a high risk of human infection therefore toxoplasmosis study indicates the need for further disease monitoring in Ukraine.

Keywords: diagnosis, tachyzoites, toxoplasmosis, cell culture, oocysts.

REFERENCES

1. Aksman, A. (1985). Priobretennyy toksoplazmoz s porazheniem tsentral'noy nervnoy sistemy [Acquired toxoplasmosis with central nervous system lesions]. *Meditinskaya parazitologiya – Medical parasitology*, 5, 18-21 [in Russian].
2. Akbaev, M.S. (1998). *Parazitologiya i invazionnye bolezni zhivotnyh [Parasitology and parasitic animal diseases]*. Moscow [in Russian].
3. Galat, V.F., Berezovs'kij, A.V., Prus, M.P., & Soroka, N.M. (2003). *Parazitologiya ta invazijni hvoroby tvarin [Parasitology and invasive diseases of animals]*. Kyi'v: Vyshha osvita [in Ukrainian].
4. Beyer, T.V. Svezhova, N.V., Radchenko, A.I., & Sidorenko, N.V. (2002). Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). *Cell Biology International*, 26, 861-871.
5. Dubey, J.P. (2009). History of the Discovery of the Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39, 877-882.

УДК 619:612.11:617.71:636.1

МЕЖЕНСЬКИЙ А.О., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: mezhaavet@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ В КОНЕЙ ЗА РІЗНОГО ПЕРЕБІГУ УВЕЇТУ

У статті представлені результати дослідження показників клітинної ланки імунітету в коней за гострого, підгострого та хронічного перебігу увеїту. Показано, що в коней за гострого та хронічного увеїту реєструються вірогідні зміни показників клітинної ланки імунітету (дисбаланс Т- і В-ланок імунної системи, а також дисбаланс субпопуляцій Т-лімфоцитів на тлі зміни IPI), а за підгострого увеїту вони незначні та невірогідні. За результатами імунологічних досліджень гострий та хронічний увеїт у коней можна класифікувати як інфекційно-алергічний, що супроводжується комбінованим