

COMPARATIVE STUDY OF SERA OF PRODUCTION BRUCELLA OVIS PANEL IN THE AGID,
PROLONGED COMPLEMENT FIXATION TEST AND I-ELISA

Goncharenko-Prokof'yeva V.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

This paper presents the preliminary results of comparative study of sera of production *Brucella ovis* panel in response agar gel immunodiffusion test (AGID), prolonged complement fixation test and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA), which show the activity and sensitivity of experimental models of kit components for the detection of antibodies to *Brucella ovis* in i-ELISA, where all of 13 positive sera of *Brucella ovis* panel of the NSC "IECVM" reacted positively, all of 11 normal sera of *Brucella ovis* panel of the NSC "IECVM" reacted negatively.

УДК 578:579:636.2:619.9

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ЗАРАЖЕННЯ ОВЕЦЬ ВІРУСОМ ЛЕЙКОЗУ ВРХ – МОДЕЛЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ЗАСОБІВ, ЩО
ВПЛИВАЮТЬ НА ПЕРЕБІГ ВІРУСІНДУКОВАНИХ ПУХЛИН

Гриневич О.Й., Маркович І.Г.

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ,

Коваленко Л.В., Руденко О.П., Горбатенко С.К., Шаповалова О.В., Зданевич П.П., М'ягких Н.В., Корнєйков О.М.,
Ареф'єв В.Л., Гема І.О.

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

Онкогенез є багатоетапним і багаторівневим процесом, який залежить від геномної нестабільності, ендогенних та екзогенних факторів. До злоякісної трансформації клітин призводить накопичення незалежних мутацій та епігенетичних порушень, які ведуть до дисбалансу регуляції сигнальних шляхів, що контролюють проліферацію, ріст клітин, диференціювання та апоптоз [1, 2]. У з'ясуванні причин «запуску» пухлиноутворення вагомим підґрунтям є вивчення особливостей росту пухлин, індукованих вірусами. Згідно даних літератури, етіологічними агентами близько 15 % новоутворень людини є РНК- та ДНК-вмісні віруси [3, 4]. Серед РНК-вмісних вірусів добре відомими є віруси, що ініціюють розвиток лейкозів і лімфом [5, 6]. До даної групи належить вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ), а загальновідомою моделлю при вивченні його дії є організм овець [7]. Патогенез вірусіндукованого лейкозу та механізми розвитку інфекційного процесу у овець добре вивчені, але залишаються до кінця не розв'язаними питання про вплив імуностимулюючих препаратів на перебіг інфекційного процесу у заражених ВЛ ВРХ тварин. Одним з перспективних сучасних препаратів, маючих імуностимулюючий ефект, є вітчизняний препарат ZG-2011. Тому метою даного дослідження було вивчення впливу імуностимулюючого препарату ZG-2011 на розвиток інфекційного процесу, індукованого вірусом лейкозу великої рогатої худоби у овець.

Матеріали та методи дослідження. Для формування дослідних груп було використано 12 овець романівської породи віком 10–12 місяців з середньою живою масою 30–35 кг (2 групи по 4 тварини, які було підібрано по принципу аналогів).

1 група. Інтактний контроль. Вівцям дворазово вводили фізіологічний розчин підшкірно (у верхню третину шиї), в об'ємі 2 см³, з інтервалом 21 день.

2 група. Вівці були штучно інфіковані введенням лімфоцитів хворої на хронічний лімфолейкоз корови (підшкірно в верхню третину шиї, одноразово, в об'ємі 2,0 см³, кількість лімфоцитів – 1500).

При проведенні експерименту використовували біохімічні, гематологічні, молекулярно-генетичні, серологічні методи досліджень та методи статистичної обробки одержаних даних.

У сироватці крові тварин було визначено: рівень загальних протеїнів, білковий профіль (альбуміни, глобуліни) спектрофотометрично загальноприйнятими методами, а також вміст імуноглобулінів класів А, G, M (IgA, IgG, IgM) за Манчестера. Активність лізоциму вимірювали турбідиметричним методом за Перрі в модифікації Гранта Х.Я. та спів. Дослідження кількості циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси проводили за методом Гриневича Ю.А. шляхом осадження білкових комплексів антиген-антитіло ПЕГ–6000. Вміст серомукоїдів (Sm) у сироватці крові встановлювали спектрофотометрично за різницею оптичної густини за довжини хвиль 260 нм та 280 нм. Визначення концентрації цитокінів (інтерлейкін-1-β (IL-1-β) та γ-інтерферон (IF- γ)) проводили з використанням наборів для імуноферментного аналізу виробництва ЗАТ «ВЕКТОР-БЕСТ» Новосибірськ (Росія).

У частині гематологічних досліджень для контролю клітинного стану організму дослідних і контрольних тварин за загальноприйнятими методами визначали кількість великих гранулоцитів (ВГЛ), активність фагоцитозу нейтрофілів периферичної крові, гемоглобін, вміст і співвідношення клітин лейкоцитарної фракції різної функціональної орієнтації в окремі терміни досліджень.

Сумарну ДНК із периферичної крові тварин виділяли за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-Б» (Центральний НДІ епідеміології МОЗ РФ, Москва, Росія) згідно з протоколом виробника.

Для запобігання згортання крові як антикоагулянт використовували розчин 0,056 М цитрату натрію, 0,166 М глюкози, які додавали до крові тварин із периферичних судин у співвідношенні 1:5.

Детекцію вірусної ДНК ВЛ ВРХ у клінічних зразках здійснювали шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розробленої у лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ» у 2008 р. пари праймерів III-BLV та базового набору для проведення ПЛР «GenPakPCRMasterMix» ("Isogene", Москва, Російська Федерація) за наступною програмою:

1 крок: денатурація – 94 °С – 2 хвилини – 1 цикл;

2 крок: денатурація – 94 °С – 1 хвилина, відпал – 58 °С – 1 хвилина, синтез – 74 °С – 1 хвилина; усього – 45 циклів;

3 крок: елонгація – 74 °С – 2 хвилини – 1 цикл.

Довжина амплікона дорівнює 440 парі нуклеотидів.

Склад суміші, розрахований на одну реакцію: 10ЧПЛР-буфер – 8 мкл, праймери – по 1 мкл кожного, зразок – 10 мкл. Загальний об'єм – 20 мкл.

Як позитивний контроль використовували ДНК, екстраговану з культури клітин FLK, інфікованої вірусом лейкозу ВРХ.

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі, забарвленому етидієм бромистим, за напруги електричного поля U = 120 В протягом 30–40 хвилин та подальшої їх візуалізації в УФ-світлі з використанням трансільюмінатора. Наявність на електрофореграмі червоної смуги, що відповідає смугі позитивного контролю, свідчить про наявність збудника лейкозу в даному клінічному зразку і, отже, про інфікованість тварини вірусом лейкозу ВРХ.

Довжину отриманих ампліконів контролювали за допомогою маркера молекулярної ваги MassRules виробництва фірми Fermentas.

Наявність антитіл проти вірусу лейкозу у сироватках крові тварин визначали в реакції імунодифузії (РІД). Методично схема постановки та обліку показників РІД відповідала стандартам вимогам стосовно настанови діагностичного набору ТОВ «НДП «Ветеринарна Медицина».

Проби периферичної крові тварин досліджували в динаміці з інтервалом 2–4 тижні.

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз отриманих результатів біохімічних досліджень свідчить, що зараження тварин упродовж досліджуваного періоду не викликало суттєвих змін концентрації загального білка відносно показників першої контрольної групи. Разом з тим, у тварин, які були заражені ВЛ ВРХ, спостерігався перерозподіл білкових фракцій сироватки крові. Так, упродовж 6–12 тижнів досліджуваного рівень альбуміну підвищився на 15,4–25,4 % ($P < 0,05$), а глобулінів знизився на – 19,3–29,0 % відносно показників контрольної групи у відповідні терміни досліджень. У той же час з розвитком інфекційного процесу відбулось посилення синтезу ІgM відносно контролю: через 5 тижнів їх рівень перевищував контрольні показники на 25,9 %, через 6 – на 40,0 %, у наступні терміни дослідження близько 37,5 % ($P < 0,05$). Таким чином, у заражених ВЛ ВРХ овець ІgM з'являється на першому етапі імунної відповіді та запускає процес її пригнічення, про що свідчить, зокрема, зниження продукції ІgA на протязі всього досліджуваного періоду.

Інфікування тварин призвело до коливання активності лізоциму. Зниження цього показника на 19,5 % зафіксовано через 3 тижні досліджуваного періоду, до 10 тижня, відбувалась поступальна активізація ферменту – до 57 % ($P < 0,05$). Через 12 тижнів рівень цього показника наблизився до контрольних значень. У овець експериментальних груп, починаючи з 3-го тижня й до кінця досліджуваного періоду, спостерігалось стале зниження концентрації ЦІК (на 15–48,3 %) ($P < 0,05$) та підвищення рівня Sm (на 16–175,0 %) ($P < 0,05$). Також упродовж усього терміну дослідження стабільно високою була концентрація ІL-1- β (підвищення відносно контролю у відповідні терміни дослідження складало до 2,0 раз). Спостерігали, також, коливальні зміни рівня ІF- γ , але, починаючи з 16-го тижня досліджуваного періоду відмічена стійка тенденція до підвищення цього показника.

Аналізуючи показники периферичної крові тварин, штучно інфікованих ВЛ ВРХ, спостерігали підвищення чисельності лейкоцитів на фоні відносної нейтрофілії. Через 6 тижнів ці показники стабілізувались на рівні стартових. У тварин рівень ВГЛ підвищувався в 1,6–3 рази порівнянні з показниками, зафіксованими на початку досліджуваного періоду. Фагоцитарна активність нейтрофілів тут була не набагато вищою від стартових показників з великою різницею поглинальної спроможності активованих клітин – на 25 % (2 група) тварин. Число Райта було нижче від початкового значення.

Перед проведенням досліджуваного періоду всі піддослідні тварини були перевірені на відсутність провірусної ДНК ВЛ ВРХ. Дослідження периферичної крові овець після введення піддослідним групам фізіологічного розчину та лімфоцитів від хворої на лейкоз корови було проведено упродовж 28 тижнів. У тварин, які були заражені ВЛ ВРХ, вже починаючи з першого тижня спостережень постійно виявляли провірусну ДНК ВЛ ВРХ. Варто зауважити, що упродовж усього терміну спостережень використовували лише якісний метод молекулярно-генетичного обстеження проб крові.

Спостереження за динамікою серологічних показників периферичної крові заражених ВЛ ВРХ овець проводили з інтервалом 2 тижні. Встановлено, що вдругі групі овець однієї з тварин на 10 тижні досліджуваного періоду проявилась слабо виражена сероконверсія з оцінкою \pm . У подальшому інтенсивність розвитку інфекційного процесу у цієї тварини посилювалась, титри антитіл зросли до рівня 1:4–1:8. Слід зауважити, що в інших тварин 2 групи антитіла в діагностичному титрі в РІД не виявляли при кожному подальшому діагностичному дослідженні, хоч наявність провірусної ДНК фіксувалась в кожному випадку при проведенні молекулярно-генетичних досліджень. Причину затримки розвитку сероконверсії у трьох тварин 2 групи після ефективного зараження потрібно додатково вивчати.

Висновки. Проведені комплексні дослідження підтверджують доцільність використання овець в якості моделі, відтворюючої інфекційний процес після зараження вірусом лейкозу ВРХ для використання цієї моделі з метою оцінки ефективності впливу на імунну систему перспективних імуномодулюючих препаратів.

Список літератури

1. Oncogenic path way signature sinhumanca ncersas a guide to targeted the rapies [Text] / A.H. Bild [et al.]// Nature. – 2006. – Vol.439, № 7074. – P. 353–357.
2. Weinstein, I.B. Mechanisms of disease: Oncogene activation—a rationale for molecular targeting in cancer therapy [Text] / I.B. Weinstein, A.K. Joe // Nat. Clin. Pract. Oncol. – 2006. – Vol.3, № 8. – P. 448–457.
3. Boccardo, E. Viral origin in soft human cancer [Text] / E. Boccardo, L.L. Villa // Curr. Med. Chem. – 2007. – Vol. 14 (24). – P. 2526–2539.
4. Лихтенштейн, А.В. Канцерогенез: эволюция представлений [Текст] / А.В. Лихтенштейн // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 4. – С. 437–447.
5. Вирусный канцерогенез: современный взгляд на проблему [Текст] / К. Алибек [и др.] // Лікарська справа. – 2007. – № 5–6. – С. 3–25.
6. Савцова, З.Д. Стимуляция процессов, индуцированных модельными онкорнавирусами, при гриппозной инфекции [Текст] / З.Д. Савцова // Иммунологические аспекты вирусного онкопролиферизма. – Рига : Зинатне, 1977. – С. 80–88.
7. Лейкоз сельскохозяйственных животных [Текст] / В.А. Бусол [и др.]. – К.: Урожай, 1988. – 264 с.

BLV EXPERIMENTAL INFECTION OF SHEEP – A MODEL TO STUDY DRUGS AFFECTING MANIFESTATION OF VIRUS-INDUCED TUMORS

Markovych I.G., Grynevych O.I.

State Center of Biotechnologies, Kyiv

Kovalenko L.V., Rudenko E.P., Gorbatenko S.K., Shapovalova O.V., Zdanevich P.P., Mjagkich N.V., Korneykov A.N., Arefyev V.L., Gema I.A.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Results on the effect of immunostimulating drug ZG-2011 on the development of infectious process in sheep, experimentally infected with bovine leukemia virus, are presented in the paper.