

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, АНТИБІОТИКІВ ТА СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН

Стегній М. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
м. Харків, Україна, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

У статті викладено результати досліджень з вивчення механізмів впливу кріоконсервування на цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин тваринного походження: CEF, FLK-SBBL, Mark-145, McCoу; хімічних речовин (антибіотиків та солей важких металів) на цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин тваринного походження (PTP, LEK, FLK-SBBL). Виявлена невисока мітотична активність культур клітин McCoу та CEF після кріоконсервування. Визначено тенденцію збільшення патологічних форм мітозів під впливом лінкоміцину та сульфату марганцю.

Ключові слова: перещеплювані культури клітин, кріоконсервування, антибіотики, солі важких металів, мітотична активність, патологічні мітози

Найбільш актуальним на цей час у напрямку біотехнології культур клітин є вивчення цитогенетичної стабільності культур клітин під дією різних факторів. Перебудови у ДНК клітин можуть бути причиною переродження біологічного матеріалу з подальшою втратою його властивостей. Сучасна оцінка впливу багатьох факторів об'єктів дозволить уникнути багатьох помилок у наступній роботі з ними, що сприятиме значному заощадженню матеріалів і ресурсів. Зміни генетичної варіабельності клітинних ліній під дією різних факторів найбільш доцільно досліджувати з використанням сучасних цитогенетичних методів [1, 2, 3, 4].

Для збереження культур клітин найбільш широко використовують їх низькотемпературне кріоконсервування в умовах рідкого азоту [5]. Застосування кріопротекторів дозволяє знизити ушкоджуючу дію фізико-хімічних факторів при кріоконсервуванні. Використовують різні кріопротектори: сахарозу, декстран, етиленгліколь, полівінілпірролідон (ПВП), диметилсульфоксид (ДМСО), поліетиленоксиди (ПЕО) та ін. Однак, як свідчать дані літератури та експериментальні результати, що отримані в лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ», ці кріопротектори в більшості є токсичними для біологічних об'єктів. Головними характеристиками властивостей кріозахисних середовищ повинні бути висока кріозахисна здатність і відсутність токсичності та мутагенності.

Ушкодження клітини – результат впливу на неї безлічі агентів. Природа фактора, що ушкоджує, може бути фізична, хімічна й біологічна. До хімічних факторів слід віднести органічні й неорганічні кислоти й луги, солі важких металів, цитотоксичні з'єднання й лікарські засоби. Ушкодження клітини може виникати як при надлишку, так і при дефіциті того самого агента [4, 6].

Мета роботи. Вивчити вплив умов кріоконсервування, антибіотиків і солей важких металів на цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин кріобанку ННЦ «ІЕКВМ».

Матеріали та методи. Для вивчення впливу умов кріоконсервування на цитогенетичні характеристики вищезазначених культур клітин їх було кріоконсервовано на 3–4 добу росту за загальноприйнятими методами [1, 7, 8]. Суміш кріопротекторів додавали до клітинної суспензії в останню чергу до кінцевої концентрації 5–10 % у кріозахисному середовищі. Кріозахисні суміші також включали різний кількісний склад нативної та ембріональних сироваток у кінцевих концентраціях від 10 до 20 %. Для кріоконсервування було використано режим, що передбачає на першому етапі охолодження суспензії клітин у кріопробірках ємністю 1,8 см³ або 4,5 см³ з концентрацією 10–12 млн./см³ в умовах гіпотермії за температури 4 °С – 6 °С протягом 30 хвилин, на другому – в апараті програмного заморожування до мінус 70 °С із швидкістю пониження температури 0,5 °С – 1 °С на хвилину, з наступним зануренням у рідкий азот зі швидкістю 300–400°С/хв.

Розморожування клітин культури Mark-145, McCoу, CEF, та FLK-SBBL здійснювали за допомогою водяної бані за температури 37–38 °С, після чого вони були піддані центрифугуванню за 800 об./хв для видалення кріозахисного середовища. Ресуспендування клітин здійснювали у ростовому середовищі, яке включало суміш поживних середовищ DMEM та 199 (1:1) з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) до концентрації 130–150 тис. кл./см³.

Після чого для вивчення мітотичного режиму культуру клітин вирощували на накривних скельцях у пеніцилінових флаконах за температури 37 °С впродовж чотирьох діб. Вирощений моношар клітин було зафіксовано у спирт-оцтовому розчині протягом 10 хвилин, проведено через спирти з підвищеною концентрацією, промито дистильованою водою, пофарбовано барвником Карачі впродовж 10 хв. Після фарбування препарати було промито, зневоднено спиртом з підвищеною концентрацією, наприкінці – спирт-ксилолом з підвищеною концентрацією, а потім – чистим ксилолом на протязі 3 хв. Після висушування на повітрі препарати клітин покривали канадським бальзамом чи полістиролом, з наступним вивченням за допомогою імерсійного світового мікроскопу.

Для вивчення впливу антибіотиків та солей важких металів на цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин свині (PTP), легень ембріона корови (ЛЕК) та FLK-SBBL біомаса цих культур клітин була напрацьована шляхом їх висіву у концентраціях відповідно 130–180 тис. клітин/см³ та вирощування в культуральних посудинах ємністю 1500 см³ з застосуванням ростових середовищ наступного складу: суміші поживних середовищ DMEM та 199 (1:1) з додаванням 10 % сироватки крові

великої рогатої худоби (ВРХ), за температури 37 °С. Для вивчення впливу антибіотиків та солей важких металів на цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин було сформовано сім груп: одна контрольна та шість дослідних:

1. Перещеплювана культура клітин, поживне середовище, цефтриаксон у кінцевій концентрації 100 мг/л.
2. Перещеплювана культура клітин, поживне середовище, лінкоміцин у кінцевій концентрації 9 мг/л.
3. Перещеплювана культура клітин, поживне середовище, гентаміцин у кінцевій концентрації 5 мг/л.
4. Перещеплювана культура клітин, поживне середовище, флюконазол у кінцевій концентрації 6 мг/л.
5. Перещеплювана культура клітин, поживне середовище, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ у кінцевій концентрації 3,93 мг /л.
6. Перещеплювана культура клітин, поживне середовище, MnSO_4 у кінцевій концентрації 1,375 мг/л.
7. Контроль – Перещеплювана культура клітин, поживне середовище.

Цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин було вивчено за показниками змін мітотичного режиму (мітотична активність, процент патологічних мітозів та ін.), і морфологічного стану клітин.

Результати досліджень. Для вивчення умов кріоконсервування на цитогенетичні характеристики перещеплюваної культури клітин Mark-145 (клітини нирки африканської зеленої мавпи) були порівняні три варіанти кріозахисних середовищ: 1. Сироватка ембріональна – 95%, димексид — 5 %. 2. Середовище Ігла – 70 %, сироватка ембріональна – 20 %, димексид – 10 %. 3. Середовище Ігла – 70 %, сироватка нативна – 20 %, димексид – 10 % (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив умов кріоконсервування на цитогенетичні характеристики перещеплюваної культури клітин Mark-145

Умови кріоконсервування	Час росту клітин, год							
	24		48		72		96	
	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів
95% ембр. сироватки 5% димексид	9,67 ±1,33	-	18,67 ±0,88	0,67 ± 0,33	17,00 ±1,00	1,33 ± 0,67	4,00 ±0,00	-
70 % пож. середов. 20% ембр.с 10% димексид	3,67 ±0,33	-	15,67 ±0,88	-	18,00 ±1,00	1,33 ±0,33	26,33 ±0,67	1,33 ±0,33
70 % пож. середов. 20%нат. сир. 10% димексид	11,33± 1,20	-	17,00 ±2,00	1,00 ±0,00	18,00 ±0,58	1,00 ±0,00	8,33 ±0,33	-

Після розморожування збереженість клітин Mark-145 досягала 95 % під захистом 95 % ембріональної сироватки та 5 % димексиду, у порівнянні з 90 % у контрольному варіанті (20 % нативної сироватки крові ВРХ, 10 % димексиду) та з 92 % у варіанті з 20 % ембріональної сироватки, 10 % димексиду. Клітини були висіяні з посівною концентрацією 40 тис. кл./см³. Після чого їх культивували за температури 37 °С впродовж чотирьох діб.

При аналізі отриманих даних виявлено, що найбільша мітотична активність була у всіх розморожених клітин на третю добу росту та достовірно не відрізнялась у жодній із трьох груп. Кількість патологічних форм мітозів найбільша коливалась від 0,67 % до 4,00 % від кількості клітин у поділі при заморожуванні у кріозахисному середовищі, що містило 95% ембріональної сироватки та 5 % димексиду. Серед патологічних форм мітозів спостерігали «к-мітози» та «полу метафазу».

Межі коливання числа хромосом культури Mark-145 при кріоконсервуванні з 95 % ембріональної сироватки та 5% димексиду складали (31–58) хромосом; у варіанті кріоконсервування в суміші 70 % поживного середовища, 20 % ембріональної сироватки та 10 % димексиду межі коливання складали (35–53) хромосом з модальною групою 49, яку містило 20 % клітин. У варіанті кріоконсервування в суміші 70 % поживного середовища, 20 % нативної сироватки та 10 % димексиду межі коливання кількості хромосом складали (36–60) хромосом з модальною групою 47, яку містило 20 % клітин.

Для вивчення впливу умов кріоконсервування на цитогенетичні характеристики перещеплюваної культури клітин McCoу було порівняно два варіанти середовищ кріоконсервування: 1) 85 % середовища 199, 10 % ембріональної сироватки та 5 % димексиду; 2) 70 % середовища 199, 20 % нативної сироватки та 10 % димексиду (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив умов кріоконсервування на цитогенетичні характеристики перещеплюваної культури клітин McCoу

Умови кріоконсервування	Час росту клітин, годин							
	24		48		72		96	
	Мітотична активність, ‰	% пат. мітозів	Мітотична активність, ‰	% пат. мітозів	Мітотична активність, ‰	% пат. мітозів	Мітотична активність, ‰	% пат. мітозів
85% середовище 199 10% ембріон. сироватка 5% димексид	2,67 ±0,33	-	6,00 ±0,58	-	7,00 ±0,58	-	5,00 ±0,58	-
70 % серед. 199 20% нат. сироватка 10% димексид	2,33±0,33	-	7,00 ±0,58	-	8,33 ±0,33	-	6,67 ±0,67	-

Збереженість клітин у першому варіанті заморожування була 28 %, у другому – 35 %.

При аналізі отриманих даних виявлена невисока мітотична активність культури клітин McCoу після кріоконсервування в обох варіантах кріозахисного середовища. Найбільша мітотична активність була у клітин, які кріоконсервували під захистом кріозахисного середовища до складу якого входило 70 % поживного середовища, 20 % нативної сироватки, 10 % димексиду на третю добу росту і складала 8,33 ‰.

Межі коливання числа хромосом культури McCoу при кріоконсервуванні з 85 % середовища 199, 10 % ембріональної сироватки та 5 % димексиду складали (44–74) хромосом з модальною групою 57, яку містило 12 % клітин. У варіанті кріоконсервування культури клітин McCoу в суміші 70 % середовища 199, 20 % нативної сироватки та 10 % димексиду межі коливання кількості хромосом складали (40–5) хромосом та мали дві модальні групи (54–56), яке містило 16 % клітин і (63–64), яке містило також 16 % клітин.

Для вивчення впливу умов кріоконсервування на цитогенетичні характеристики перещеплюваної культури клітин CEF (перещеплювана культура фібробластів курей) були порівняні два варіанти кріозахисних середовищ: 1) контроль – кріозахисне середовище до складу якого входило середовище 199–70 %; сироватка нативна – 20 %; димексид – 10 %; 2) дослід – середовище 199–68 %, сироватка нативна – 20 %, димексид – 10 %, гліцерин – 2 % (табл. 3).

Таблиця 3 – Вплив умов кріоконсервування на цитогенетичні характеристики перещеплюваної культури клітин CEF

Умови кріоконсервування	Час росту клітин, годин							
	24		48		72		96	
	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів
70 % серед. 199 20% нативна сироватка. 10% димексид	4,67 ± 0,67	-	8,33 ±0,33	-	5,67 ±0,67	-	4,67 ±0,33	-
68 % серед. 199 20% нативна сироватка 10% димексид 2% гліцерин	3,67±0,33	-	7,33 ±0,88	-	5,33±0,33	-	4,00 ±0,58	-

Після розморожування збереженість клітин була 83 % у контрольному варіанті, та 82 % – у дослідному. Висівалась клітинна суспензія з посівною концентрацією 145 тис. кл./см³. Після чого їх культивували за температури 37 °С впродовж чотирьох діб.

Показано, що після криоконсервування клітини частково втрачають свої адгезивні властивості і не формують повного моношару при культивуванні.

При аналізі отриманих даних виявлено невисока мітотична активність культури клітин після розморожування в обох варіантах криозахисного середовища. Найбільша мітотична активність була у клітин, які криоконсервовані у котрольному варіанті криозахисного середовища (70 % поживне середовище, 20 % нативна сироватка та 10 % димексид) на другу добу росту і складала 8,33 %, що незначно відрізнялось від дослідного варіанту (7,33 %).

Вивчення механізмів впливу антибіотиків та солей важких металів на цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин свині (РТР), легень ембріона корови (ЛЕК) та FLK – SBBL показало, що у перещеплюваної культури клітин тестикул свині (РТР) максимальна мітотична активність впродовж перших двох діб спостерігалась під впливом **флюконазолу** (табл. 4).

Таблиця 4 – Вплив антибіотиків та солей важких металів на цитогенетичні характеристики перещеплюваної культури клітин РТР

Варіанти культивування	Час росту клітин, год							
	24		48		72		96	
	Мітотична активність, %	% патологічних мітозів	Мітотична активність, %	% патологічних мітозів	Мітотична активність, %	% патологічних мітозів	Мітотична активність, %	% патологічних мітозів
Контроль культури клітин	23,67±0,67	5,67±1,52	47,33±1,67	5,67±0,81	30,0±1,73	3,33±0,20	37,33±0,33	5,97±1,57
цефтриаксон 100 мг/л	28,67±1,20	12,73±0,90	39,67±0,33	7,57±1,44	52,00±1,53	5,87±1,02	37,33±0,33	6,27±0,92
гентаміцин 5мг/л	38,67±1,20	4,20±0,60	49,00±2,52	2,73±0,74	39,00±0,58	3,40±0,85	24,00±1,15	5,73±1,69
лінкоміцин 9мг/л	26,00±0,58	3,83±0,09	35,00±0,58	3,80±0,95	37,00±1,53	8,90±1,63	34,00±0,58	4,93±2,03
флюконазол 6мг/л	43,67±1,67	3,07±0,87	52,33±0,88	2,50±0,60	40,00±1,15	4,17±0,94	20,33±1,20	6,53±1,52
CuSO ₄ ×5H ₂ O 3,93мг/л	35,00±0,58	3,77±1,07	41,33±1,76	7,17±1,83	46,33±1,86	5,73±0,71	30,33±1,20	3,30±0,15
MnSO ₄ 1,375мг/л;	31,00±0,58	3,20±0,06	37,00±1,15	7,10±3,04	28,33±0,88			

У контролі мітотична активність зростала поступово з максимумом на другу добу (47,3 % ± 1,7) та зниженням до (22,3 % ± 0,3) на четверту добу. Максимальна мітотична активність (52,0 % ± 1,5) культури клітин тестикул свині під впливом **цефтріаксону** спостерігалась на третю добу контакту.

Найбільша, у порівнянні з контролем і дослідними зразками процентна кількість патологічних мітозів була виявлена на третю (17,8 % ± 0,5) та на четверту добу контакту (13,7 % ± 1,34) **сульфату марганцю** в перещеплюваної культури клітин (РТР). Серед патологічних форм мітозів перещеплюваної культури (РТР) преваюють пола метафаза та трьох полюсний мітоз (рис. 1; 2; 3).

Згідно паспорту якості перещеплюваної лінії клітин РТР, кількість хромосом у клітинах коливається від 36 до 60 з модальною групою 38–40 (51 %).

У контролі межа коливання хромосом від 28 до 43 з модальною групою 38 (21 %).

У варіанті використання у поживному середовищі цефтриаксону 100 мг/л межа коливання хромосом від 28 до 44 з модальною групою 32–34 (40 %).

У варіанті використання у поживному середовищі гентаміцину 5 мг/л межа коливання хромосом від 30 до 44 з модальною групою 38 (32 %).

У варіанті використання у поживному середовищі лінкоміцину 9 мг/л межа коливання хромосом від 30 до 46 з модальною групою 38 (22 %).

У варіанті використання у поживному середовищі флюконазолу (діфлюкану) 6 мг/л межа коливання хромосом від 30 до 45 з модальною групою 38 (34 %).

У варіанті використання у поживному середовищі сульфату міді 3,93 межа коливання хромосом від 30 до 44 з модальною групою 38 (30 %).

У варіанті використання у поживному середовищі сульфату марганцю 1,375 мг/л межа коливання хромосом від 32 до 46 з модальною групою 38 (33 %).

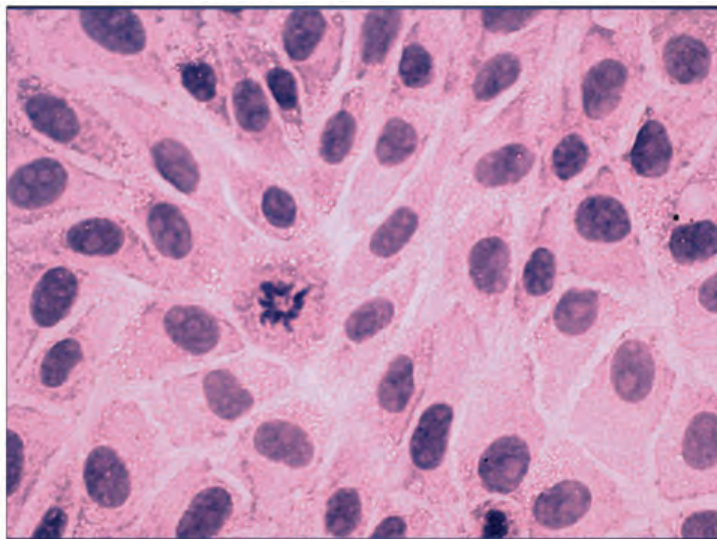


Рис. 1. Перещеплювана культура клітин (РТР), у центрі патологічна форма мітозу – полярна метафаза Об×100 Ок×4,5

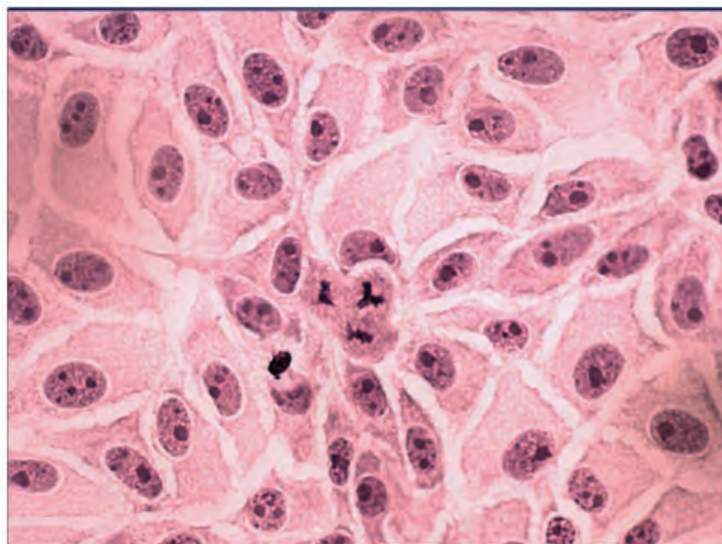


Рис. 2. Перещеплювана культура клітин (РТР), у центрі патологічна форма мітозу – трьох полюсний мітоз Об×100 Ок×4,5

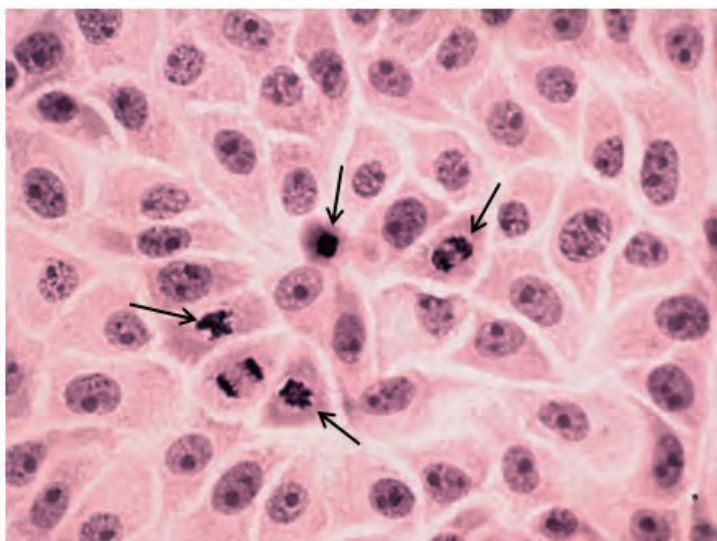


Рис. 3. Перещеплювана культура клітин (РТР), стрілками показані патологічні форми мітозу – полярна метафаза, хромосомний міст Об×100 Ок×4,5

Вивчення мітотичної активності перещеплюваної культури клітин ЛЕК показало, що найбільша мітотична активність спостерігалась у контролі ($41,67\% \pm 1,2$) протягом першої доби культивування з поступовим зниженням мітотичної активності до ($21,67\% \pm 1,4$) на четверту добу. Вплив досліджених хімічних речовин (антибіотиків і солей важких металів) привів до зниження показників мітотичної активності перещеплюваної культури клітин ЛЕК. Слід відмітити тенденцію збільшення патологічних форм мітозів під впливом лінкоміцину.

Згідно паспорту якості перещеплюваної лінії клітин ЛЕК число хромосом у клітинах коливається від 34 до 61 з модальною групою 40–44 (48 %).

Контроль культури межа коливання хромосом від 34 до 58 з модальною групою 46 (30 %).

У варіанті використання у поживному середовищі цефтриаксону 100 мг/л межа коливання хромосом від 38 до 54 з модальною групою 44–46 (46 %).

У варіанті використання у поживному середовищі гентаміцину 5 мг/л межа коливання хромосом від 36 до 52 з модальною групою 40–44 (66 %).

У варіанті використання у поживному середовищі лінкоміцину 9 мг/л межа коливання хромосом від 36 до 54 з модальною групою 44–46 (43 %).

У варіанті використання у поживному середовищі діфлюкану (флюконазол) 6 мг/л межа коливання хромосом від 34 до 54 з модальною групою 44–46 (46 %).

У варіанті використання у поживному середовищі сульфату міді 3,93 межа коливання хромосом від 32 до 56 з модальною групою 40 (40 %).

У варіанті використання у поживному середовищі сульфату марганцю 1,375 мг/л межа коливання хромосом від 32 до 52 з модальною групою 40 (31 %).

Мітотична активність перещеплюваної культури клітин **FLK-SBBL** також як і культури клітин тестикул свині в контролі зростала поступово з максимумом на другу добу ($37,0\% \pm 2,12$) і зниженням до ($20,67\% \pm 1,08$) на четверту добу. Вплив антибіотиків і солей важких металів призвів до зниження показників мітотичної активності перещеплюваної культури клітин FLK-SBBL у порівнянні з контролем.

Згідно паспорту якості перещеплюваної лінії клітин FLK SBBL число хромосом у клітинах коливається від 54 до 86, модальну групу хромосом не виявлено.

Контроль культури - межі коливання хромосом від 54 до 84.

Варіант з використанням у поживному середовищі цефтриаксону 100 мг/л межі коливання хромосом від 46 до 74.

У варіанті використання у поживному середовищі гентаміцину 5 мг/л межі коливання хромосом від 50 до 72.

Варіант з використанням у поживному середовищі лінкоміцину 9 мг/л межі коливання хромосом від 48 до 74.

У варіанті використання у поживному середовищі діфлюкану 6 мг/л межі коливання хромосом від 44 до 72.

Варіант з використанням у поживному середовищі сульфату міді 3,93 межі коливання хромосом від 44 до 72.

У варіанті використання у поживному середовищі сульфату марганцю 1,375 мг/л межі коливання хромосом від 54 до 80. Мітотична активність всіх розморожених клітин Mark-145 була максимальною ($18,0 \pm 1,0$) % на другу-третю доби росту та достовірно не відрізнялась в жодній із трьох груп. Кількість патологічних форм мітозів складала 0,67 %.

Висновки. Виявлена невисока мітотична активність культур клітин McCoу та CEF після кріоконсервування в обох варіантах кріозахисного середовища. Найбільша мітотична активність (8,33 %) була у клітин, які кріоконсервували у кріозахисному середовищі до складу якого входило 70 % поживного середовища, 20 % нативної сироватки, 10 % димексиду на третю добу росту після розморожування.

Мітотична активність всіх розморожених клітин Mark-145 була максимальною ($18,0 \pm 1,0$) % на другу-третю доби росту та достовірно не відрізнялась в жодній із трьох груп. Кількість патологічних форм мітозів складала 0,67 %.

Вивчення механізмів впливу антибіотиків і солей важких металів на цитогенетичні характеристики перещеплюваних культур клітин свині (РТР) показало, що максимальна мітотична активність впродовж перших двох діб спостерігалась під впливом флюконазолу.

Вплив антибіотиків і солей важких металів привів до зниження показників мітотичної активності перещеплюваної культури клітин ЛЕК. Визначено тенденцію збільшення патологічних форм мітозів під впливом лінкоміцину та сульфату марганцю. У варіанті використання у поживних середовищах діфлюкану, сульфату міді, сульфату марганцю збільшувались межі коливання кількості хромосом. Вплив антибіотиків і солей важких металів привів до зниження показників мітотичної активності перещеплюваної культури клітин FLK-SBBL.

Список літератури

1. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) [Текст] / Под общ. ред. проф. Дьяконова Л. П. – М.: Издательство «Спутник+», 2009. – 656 с.
2. Стегний Б. Т. Использование методов биологического контроля клеточных культур, применяемых в ветеринарной вирусологии [Текст] / Б.Т. Стегний, В. С. Белоконь, А. А. Лаврик // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2005. – Вип. 85. – С. 1018-1021.
3. Стегній М.Ю. Цитогенетичні характеристики сублінії перещеплюваної культури клітин FLK 50/100 під впливом наночастинок Аргентуму та Цинку [Текст] // М.Ю. Стегній, Д.Ю. Магац, О.М Юрченко // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. збірник – Х. 2014. – Вип. 99. – С. 182-186.
4. Стегний М. Ю. Цитогенетические показатели культуры клеток ИЕС-6 под воздействием препаратов Фитоверм и Номолт [Текст] / М.Ю. Стегний, Н. Д. Пшеничная // Вісник аграрної науки: наук.-теорет. журн. – Київ: Аграрна наука, 2008. – Вип. 8. – С. 19-24.

5. Кримоконсервирование клеточных суспензий [Текст] / Под общ. ред. проф. А.А.Цуцаевой – Киев.: Наукова думка 1983. – 240 с.
6. Стегній М. Ю. Вплив наночастинок Аргентуму та Двоокису Мангану на цитогенетичні показники перещеплюваної культури клітин FLK-BLV [Текст] / М. Ю. Стегній, Д. Ю. Магац, О. М Юрченко // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. збірник – Х. 2014. – Вип. 98. – С. 188-192.
7. Мамаева С. Е. Цитогенетика клеток в культуре [Текст] / С. Е. Мамаева // Биология клеток в культуре: Сб. статей. – Л.: Наука, 1984. – С. 199-235.
8. Мамаева С. Е. Хромосомный анализ культивируемых клеток [Текст] / С. Е. Мамаева // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. – С. 78-98.

**STUDY OF INFLUENCE OF TERMS OF CRYOPRESERVATION,
OF ANTIBIOTICS AND SALTS OF HEAVY METALS ON CYTOGENETIC
DESCRIPTIONS OF CELL CULTURES**

Stegniy M. Yu.

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

The article presents the results of a study of mechanisms of cryopreservation influence on cytogenetic descriptions of the continuous cell lines of animal origin: CEF, FLK – SBBL, Mark – 145, McCoy, chemicals (antibiotics and salts of the heavy metals) on cytogenetic characteristics of the continuous cell lines of animal origin (PTP, LEK, FLK – SBBL). It was found out a low mitotic activity of McCoy and CEF cell lines after cryopreservation. The tendencies of increasing mitosis pathological forms under the lincomycin and manganese sulfate influence were determined.

Keywords: *continuous cell line, cryopreservation, antibiotics, heavy metal salts, mitotic activity, abnormal mitosis*

УДК: 576.535:576.353:[546.47+546.56/.57+546.72]-022.532

**ЦИТОПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ
ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН FLK-BLV ПІД ВПЛИВОМ
НАНОКАРБОКСИЛАТІВ МЕТАЛІВ**

Стегній М. Ю., Магац Д. Ю.

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua*

Вивчені цитогенетичні характеристики (мітотична активність та кількість патологічних форм мітозів) двох субліній перещеплюваної культури клітин FLK-BLV (FLK-SBBL та FLK-71) під впливом нанокарбоксилатів Аргентуму, Цинку, Феруму та Купруму. Проаналізована можливість використання новітніх розробок нанотехнологій при біотехнологічному виготовленні лейкозного антигену, який у подальшому використовується для діагностичних тест-систем по виявленню лейкозу великої рогатої худоби. Нанокарбоксилати Цинку та Купруму виявили негативну дію на клітини субліній FLK-BLV. У клітинах при взаємодії з наносполуками Аргентуму та Феруму мітотична активність була нижча за контроль, але зменшувалась кількість патологічних мітозів за весь час проведення дослідів.

Ключові слова: *перещеплювана культура клітин FLK-BLV, вірус лейкозу великої рогатої худоби, наносполуки металів, мітотична активність, патологічні мітози*

Характерною особливістю інфекційного лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) є, як правило, довічна персистенція вірусу та вірусспецифічних антитіл (АТ) у хворої тварини. Тому серологічні методи виявлення специфічних АТ є найбільш практичними, економічними та широко використовуються в діагностиці онковірусної інфекції у ВРХ [1, 2].

На сьогодні за даними Міжнародного Епізоотичного Бюро (МЕБ) референтним методом діагностики лейкозу великої рогатої худоби є реакція імунодифузії (РІД). Цей чутливий тест виявляє глікопротеїн вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ) у концентрації 0,4 мкг/см³. Однак забезпечення високого рівня точності та ефективності РІД залежить від якості специфічного антигену gr51 [3]. Виготовлення діагностичному потребує великої кількості вірусного антигену. Його джерелом є перещеплювана культура клітин FLK-BLV, яка вперше отримана в 1974 р. Van Der Maaten шляхом сокультивування ембріональних клітин