

5. Кримоконсервирование клеточных суспензий [Текст] / Под общ. ред. проф. А.А.Цуцаевой – Киев.: Наукова думка 1983. – 240 с.
6. Стегній М. Ю. Вплив наночасток 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/см<sup>3</sup>. 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 перещеплювала культура клітин FLK-BLV, яка вперше отримана в 1974 р. Van Der Maaten шляхом сокультивування ембріональних клітин

нирки вівці з лімфоцитами лейкозної корови. Ця лінія клітин застосовується для біохімічних, морфологічних і серологічних досліджень [4, 5].

За даними літератури відомі спроби підвищення продукції вірусу лейкозу в культурі клітин FLK-BLV методом застосування різноманітних стимулюючих препаратів, гормонів, вітамінів, а також підбором оптимального співвідношення складу живильного середовища [6, 7].

Останнім часом широкого розповсюдження набуло застосування наночастинок, загалом у сфері біології та медицини. Увага до наноматеріалів пов'язана з їх хімічними та фізичними особливостями. При переході в нанорозмірний стан відбувається зміна ряду фундаментальних властивостей речовини – зі збільшенням питомої поверхневої енергії змінюється поверхневий натяг, температура плавлення, може змінитися сама структура, електронні характеристики. Тобто весь спектр фізико-хімічних властивостей стає іншим, ніж для речовин у макростані. Основним фактором, який визначає унікальні фізико-хімічні характеристики нанорозмірних об'єктів, є високе відношення площі їх поверхні до об'єму, що забезпечує їй високу реакційну здатність [8, 9]. Нові матеріали різноманітні і мають унікальні властивості: високу міцність, теплоізолюючу здатність, протимікробну дію тощо. Останнім часом визначення наночастинок пов'язують не з їх розміром, а з проявом у них нових властивостей, відмінних від властивостей об'ємної фази. Тому збільшується ймовірність розвитку різних процесів усередині окремих клітинних структур: органел, біологічних мембран, проникнення та контакт з клітинним ядром і ДНК [10].

У зв'язку з цим **метою** роботи було вивчення впливу наносполук на мітотичну активність та кількість патологічних мітозів перещеплюваної культури клітин FLK-BLV.

**Матеріали та методи.** У дослідженні були використані наносполуки Аргентуму (Ag), Цинку (Zn), Феруму (Fe) та Купруму (Cu). Наночастки Ag розміром розміром (30 нм), Zn розміром (5–50 нм), Fe розміром (5–50 нм) та Cu розміром (5–50 нм) являли собою хімічно-скоординовані карбоксилати металів. Наносполуки застосовували в розведенні від загальної концентрації 1:10. Суспензії наносполук були стійкі до формування конгломератів і седиментації.

В експерименті використовували дві сублінії перещеплюваної культури клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфіковані вірусом лейкозу великої рогатої худоби – FLK-SBBL та FLK-71. Сублінії належать до Колекції культур клітин тваринного походження, яка становить Національне надбання України з 2004 року, та зберігається у кріобанку Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

Біомасу клітин субліній FLK-SBBL та FLK-71 було напрацьовано шляхом висіву та вирощування у стерильних культуральних матрацах ємністю 1500 см<sup>3</sup>. При культивуванні використовували суміш поживних середовищ Ігла DMEM та 199 у співвідношенні 1:1 з додаванням 10 % нативної сироватки ВРХ (виробництва ТОВ НДП «Ветеринарна медицина», м. Харків), за температури 37 °С в умовах термальної кімнати. Пересів культур клітин проводили по мірі вивчення моношару, у середньому кожні 3–4 доби.

Для вивчення мітотичної активності та кількості патологічних мітозів субліній FLK-BLV клітини в концентрації 220 тис. клітин в 1 см<sup>3</sup> ростового середовища висівали на накривні скельця розміром 12×24 мм, які знаходилися у пеніцилінових флаконах ємністю 10 см<sup>3</sup>. Флакони в горизонтальному положенні інкубували в термальній кімнаті за температури 37 °С.

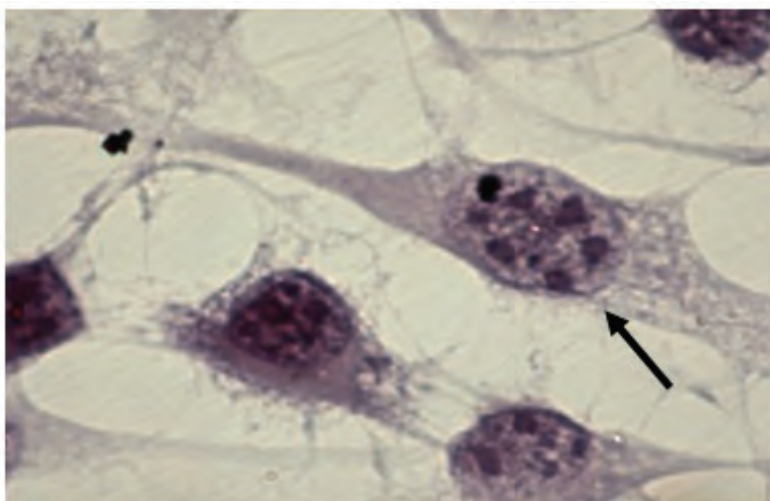
Через 24 год культивування поживне середовище було замінене, а на клітини дослідних варіантів у стадії активного росту були внесені наносполуки – карбоксилати Аргентуму, Цинку, Феруму в концентрації 1:10. Наносполуки Купруму було внесено на клітини перещеплюваної лінії FLK-SBBL. Час впливу наносполук на клітини коливався від 24 до 96 (FLK-SBBL) та 120 год (FLK-71). Після кожної доби культивування з наносполуками накривні скельця виймали з пеніцилінових флаконів, клітини фіксували в розчині льодяної оцтової кислоти та абсолютного етилового спирту у співвідношенні 1:3. Після чого препарати проводили крізь спирти підвищеної концентрації та фарбували гематоксилином Карачі відповідно до загально прийнятої методики [11].

Визначення мітотичної активності (МА) проводили підрахунком кількості клітин, що діляться, віднесеному до загального числа врахованих клітин (1000) і виражали у проміле (‰). Водночас з цим визначали кількість патологічних мітозів та їх окремих форм за класифікацією І.А. Алова по відношенню до їх загальної кількості, що приймали за 100 %. Статистичну обробку результатів досліджень проводили згідно із використанням критерія Стьюдента [12].

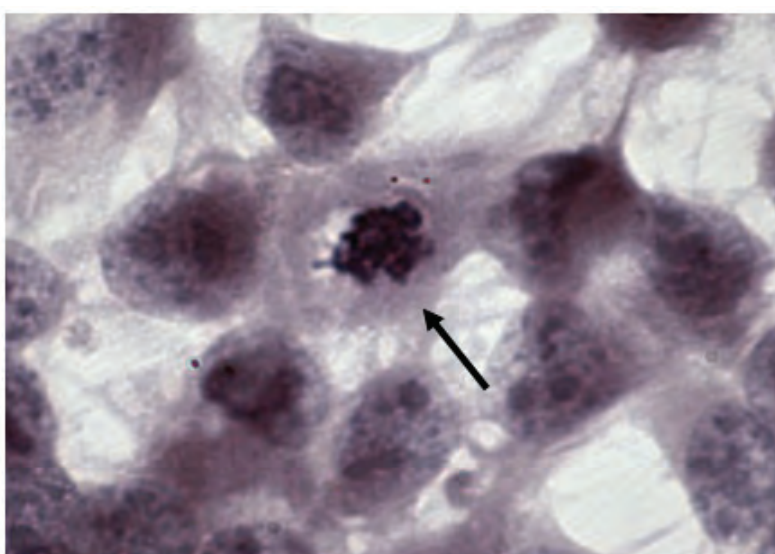
**Результати досліджень.** За методом мікроскопії у світловому мікроскопі було виявлено, що станом на 24 год культивування клітини двох субліній прикріпилися, моношар вивчився на 95–100 %. За морфологічними показниками клітини відповідали паспортним даним. Моношар сублінії FLK-SBBL складався з великих епітеліоподібних клітин, які мали округлі ядра. У культурі FLK-71 спостерігали фібробластоподібний ріст, клітини також мали округлі ядра з 2-7 дрібними ядерцями (рис. 1). У цитоплазмі обох субліній не було виявлено зернистості та вакуолізації.

Дослідження культури клітин FLK-71 показали, що у контрольному варіанті пік мітотичної активності був у першу добу – (41,75±1,25) ‰, потім цей показник поступово знижувався, і на п'яту добу становив – (9,25±0,63) ‰. Така динаміка МА може бути пов'язана з контактним гальмуванням і початком старіння клітин. При цьому рівень патологічних мітозів кожної доби був досить високим – (17,98±0,58) % на першу добу та (23,52±1,26) % на четверту відповідно. Під час дослідження клітин FLK-71 виявлено, що основною формою патологічних мітозів усіх експериментальних груп були мікроядра у великій кількості (рис. 2).

Під впливом наносполук Аргентуму 1:10 максимальний показник мітотичної активності складав (33,5 ± 1,26) ‰ у першу добу. Як і в контрольному варіанті рівень МА поступово зменшувався до (6,5 ± 0,29) ‰ на п'яту добу. Кількість патологічних мітозів була меншою за контроль у 1,6 разів у першу добу, у 1,1 рази – у другу та третю, у 1,7 разів – у четверту, а на п'яту добу перевищував контроль у 1,1 рази відповідно.



**Рис. 1.** Клітини сублінії FLK-71 (контроль). Стрілкою вказані дрібні ядерця всередині ядра клітини



**Рис. 2.** Клітини сублінії FLK-71 (контроль). Стрілкою вказано патологічну форму мітозу – мікроядра

За показником мітотичної активності схожі результати отримали при дослідженні клітин під впливом наносполук Феруму. Через 24 год дії рівень МА становив  $(34,00 \pm 0,82) \%$ , а потім знижувалась до  $(9,75 \pm 0,85) \%$  через 120 год впливу. Однак патологічних мітозів було достовірно менше, ніж в контрольному варіанті – у першу добу  $(11,68 \pm 0,94) \%$  (контроль  $17,98 \pm 0,58 \%$ ), на другу добу  $(9,39 \pm 1,3) \%$  (контроль  $17,72 \pm 0,76 \%$ ), на третю добу  $(13,62 \pm 1,76) \%$  (контроль  $18,45 \pm 1,7 \%$ ), на четверту добу  $(10,65 \pm 3,37) \%$  (контроль  $23,52 \pm 1,26 \%$ ), на п'яту  $(9,79 \pm 3,54) \%$  (контроль  $21,05 \pm 3,09 \%$ ) відповідно.

Дія наносполук Цинку сприяла пригнічванню мітотичної активності. На першу добу впливу цей показник був на 28,75% нижче за контроль. Але кількість патологічних мітозів була досить великою – п'ятої доби  $(26,90 \pm 4,93) \%$  при мітотичній активності в  $(6,00 \pm 1,08) \%$ .

Результати досліджень мітотичної активності та відсотка патологічних мітозів сублінії FLK-71 під впливом нанокарбоксилатів надано у таблиці 1.

Пік мітотичної активності (МА) інтактних клітин (контроль) сублінії FLK-SBBL спостерігався в першу добу та становив –  $(33,0 \pm 1,53) \%$ . Кількість виявлених патологічних форм мітозів була  $(9,11 \pm 0,46) \%$  від кількості клітин, що діляться. Серед патологічних форм мітозів в усіх дослідних та контрольному варіантах спостерігали полу метафазу. Через 96 год кількість патологічних форм мітозів у контролі була більша у 2 рази –  $(18,57 \pm 1,43) \%$ , ніж у першу добу культивування (табл. 2).

**Таблиця 1** – Порівняння мітотичної активності та відсотка патологічних мітозів сублінії FLK-71 під дією нанокарбоксилатів металів (M±m, n=5)

	Час експозиції, год									
	24		48		72		96		120	
	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів
Контроль культури	41,75± 1,25	17,98± 0,58	33,75± 1,18	17,72± 0,76	31,25± 0,75	18,45± 1,70	20,25± 0,95	23,52± 1,26	9,25± 0,63	21,05± 3,09
Нанокарбоксилат Ag 1:10	33,50± 1,26**	11,21± 1,39**	31,50± 0,96	15,97± 1,59	26,75± 1,25*	15,41± 4,01	16,75± 0,85*	13,40± 3,67*	6,50± 0,29**	23,21± 4,60
Нанокарбоксилат Zn 1:10	13,00± 1,22***	14,19± 2,79	11,75± 0,48***	19,01± 3,97	10,00± 0,41***	12,55± 2,52	9,00± 1,35***	19,90± 5,90	6,00± 1,08*	26,90± 4,93
Нанокарбоксилат Fe 1:10	34,00± 0,82***	11,68± 0,94***	32,00± 0,82	9,39± 1,30***	25,50± 0,50***	13,62± 1,76	18,25± 0,85	10,65± 3,37**	9,75± 0,85	9,79± 3,54*

**Примітка.** Порівняно з клітинами контрольного варіанту: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

**Таблиця 2** – Порівняння мітотичної активності та відсотка патологічних мітозів сублінії FLK-SBBL під дією нанокарбоксилатів металів (M±m, n=5)

	Час експозиції, год							
	24		48		72		96	
	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів	Мітотична активність, ‰	% патолог. мітозів
Контроль культури	33,00 ± 1,53	9,11 ± 0,46	29,00 ± 1,0	11,6 ± 1,6	20,33 ± 0,67	14,78 ± 0,5	19,67 ± 0,33	18,57 ± 1,43
Нанокарбоксилат Ag 1:10	25,33 ± 0,88**	0	17,33 ± 0,33***	7,62 ± 1,74	17,67 ± 0,33**	9,36 ± 1,74*	6,67 ± 0,33***	19,53 ± 5,24
Нанокарбоксилат Zn 1:10	12,33 ± 0,88***	0	14,33 ± 0,67***	0	7,67 ± 0,88***	0	5,67 ± 0,33***	0
Нанокарбоксилат Fe 1:10	29,00 ± 0,58*	2,3 ± 1,15***	13,33 ± 0,33***	2,56 ± 2,56*	8,0 ± 0***	0	5,67 ± 0,67***	0
Нанокарбоксилат Cu 1:10	1,67 ± 0,33***	0	0	0	0	0	0	0

**Примітка.** Порівняно з клітинами контрольного варіанту: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Під впливом наносполук Ag 1:10 максимальний показник МА складав (25,33±0,88) % у першу добу при повній відсутності патологічних мітозів. На третю добу культивування з нанокарбоксилатом Аргентуму кількість патологічних форм мітозів була достовірно нижче, ніж у контролі. На четверту добу культивування мітотична активність поступово зменшувалась майже в 3 рази у порівнянні з контролем.

У варіанті з додаванням наносполук Цинку до клітин сублінії FLK-SBBL жодної доби не виявлено патологічних форм мітозів. Показник МА був достовірно нижчий відносно контролю – у першу добу на 20,67 %, а через 96 год впливу – на 14 %.

Мітотична активність клітин у дослідних варіантах з Fe 1:10 у першу добу взаємодії була наближена до контролю та становила (29,0±0,58) %. Потім кожної доби відмічали різкий спад МА, яка на четверту добу вже була у 3,5 рази менша за контроль. Проте, кількість патологічних мітозів у першу та другу добу дії наносполук Феруму була значно нижча за контрольний варіант – (2,3±1,15) % та (2,56±2,56) %, у той час як у контролі цей показник складав (9,11±0,46) % та (11,6±1,6) % відповідно. На третю та четверту добу патологічних мітозів не виявлено, але це може бути пов'язано з пригніченням загальної мітотичної активності клітин. Наносполуки Купруму 1:10 призвели до деструкції моношару. І якщо в першу добу впливу МА сягала (1,67±0,33) %, то в подальшому на накривних скельцях клітин виявлено не було.

**Висновки.** 1. При порівнянні цитогенетичних показників клітин двох субліній (FLK-SBBL та FLK-71) під впливом наносполук металів встановлено, що нанокарбоксилати Цинку негативно впливали на мітотичну активність. Дія проявлялась у достовірному пригніченні МА. Патологічних мітозів у сублінії FLK-SBBL під впливом Zn не було виявлено жодної доби, а в контролі культури FLK-71 їх відсоток був досить високим.

2. Наносполуки Купруму призвели до повної деструкції моношару сублінії FLK-SBBL.

3. У варіантах культивування з наносполуками Ag у розведенні 1:10 мітотична активність не перевищувала рівня контролю протягом дослідження. В експерименті з культурою FLK-71 відмічали більш рівну динаміку пригнічення МА за кожну добу впливу. У двох сублініях кількість патологічних форм мітозів під дією наносполук Аргентуму була менша за контроль, а в останню добу підвищувалась до рівня контролю.

4. Нанокарбоксилати Феруму виявили різний вплив на сублінії FLK-BLV. У культурі FLK-SBBL відмічали різкий спад МА після першої доби взаємодії, у той час як в сублінії FLK-71 мітотична активність була схожа на показники МА під впливом Аргентуму – тобто відмічалось повільне її пригнічення. Характерною особливістю було достовірне зменшення відсотка патологічних форм мітозів у двох сублініях з першої по останню добу впливу наносполук Феруму.

#### Список літератури

1. Кукайн, Р. А. Вирус лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Р. А. Кукайн, Л. И. Нагаева. – Рига : Зинатне, 1982. – 175 с.
2. Петропавловский, М. В. Эффективность диагностических тестов в выявлении вируса лейкоза крупного рогатого скота в оздоравливаемых от лейкоза стадах [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук / М. В. Петропавловский. – Екатеринбург, 2010. – 26 с.
3. Вирусные болезни животных [Текст] / В. Н. Сюрин [и др.]. – М. : ВНИТИБП, 1998. – 721 с.
4. Chapter 2.4.11 Enzootic Bovine Leukosis [Text] // OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 2008. – P. 729-738.
5. Wang, H. Analysis of bovine leukemia virus gag membrane targeting and late domain function [Text] / H. Wang, K. M. Norris, L. M. Mansky // J. Virol. – 2002. – Vol. 76. – P. 8485-8493.
6. Удосконалення технології виробництва антигену для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії [Текст] / Б. Т. Стегній, [та ін.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 227-229.
7. Вивчення впливу інгібітору деацетилази гістонів на антигенпродукуючу активність перещеплюваної культури FLK-BLV [Текст] / О. В. Шаповалова [та ін.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2012. – Вип. 96. – С. 91-93.
8. Синтез, биологическая активность и цитотоксичность нанопорошков на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [Текст] / В. В. Киروشка [и др.] // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології : зб. наук. пр. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 787-798.
9. Seaton, A. Nanotechnology and the occupational physician [Text] / A. Seaton // Occupational medicine. – 2006. – Vol. 56, № 5. – P. 312-316.
10. Яковлева, Г. В. Основные подходы к оценке свойств нанообъектов [Текст] / Г. В. Яковлева, А. А. Стехина // Методолог. пробл. изуч. и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды : материалы пленума Науч. совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздравсоцразвития Российской Федерации (Москва, 17-18 дек. 2007 г.). – М., 2007. – С. 174-177.
11. Животная клетка в культуре : (Методы и применение в биотехнологии) [Текст] / Под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова, проф. В. И. Ситькова. – М. : Компания Спутник+, 2009. – 652 с.
12. Лакин, Г. Ф. Биометрия : Уч. пособие для биологических специальностей ВУЗов [Текст] / Под ред. Г. Ф. Лакина. — М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.

#### CYTOPROLIFERATIVE ACTIVITY OF LONG-TERM CELL CULTURE FLK-BLV UNDER THE INFLUENCE OF METAL'S NANOCARBOXYLATE

Stegniy M. Yu., Magats D. Yu.

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

*Studied cytogenetic indicators (number of mitotic activity and pathological mitosis) of two sublines long-term cell culture FLK-BLV under the influence of nanoparticles Silver, Zinc, Iron and Copper. The possibility of using the latest nanotechnology developments with biotechnological production of leukemic antigen, which is then used for the diagnostic test systems for the detection of bovine leukemia. Nanoparticles of Zinc and Copper found negative effects on cell sublines. In the cells by reacting with Iron and Silver mitotic activity was lower than the control, but reduces the number of pathological mitosis for the duration of the experience.*

**Keywords:** long term cell culture FLK-BLV, nanoparticles, bovine leukemia virus, mitotic activity, pathological mitosis