**УДК: 619:602:576.535:546.57-022.532:578.74**

# ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НАНОЧАСТОК АРГЕНТУМУ НА АНТИГЕНПРОДУКУЮЧУ АКТИВНІСТЬ ДВОХ СУБЛІНІЙ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ FLK-BLV

***Стегній М. Ю., Магац Д. Ю.***

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

*У статті розглядається можливість використання наночасток Арґентуму для стимуляції експресії вірусу лейкозу великої рогатої худоби та підвищення антигенпродукуючої активності двох сублінійперещеплюваної культури клітин FLK-BLV (FLK-SBBL і FLK-71). Встановлено, що під впливом наночасток Арґентуму підвищувався титр антигенів вірусу лейкозу у порівнянні з контролем. Додавання до поживного середовища Ag 1:100 викликало підвищення виходу антигену у культури клітин FLK-SBBL вдвічі, у порівняні з контролем. Об'єм фактично отриманого антигену з додаванням Ag 1:100 до культури клітин FLK-71 значно перевищував показник контрольного варіанту.*

***Ключові слова:*** *перещеплювана культура клітин FLK-BLV, вірус лейкозу великої рогатої худоби, наночастки, реакція імунодифузії*

Лейкоз великої рогатої худоби зустрічається майже в усіх країнах світу. Характерною особливістю вірусу лейкозу є виражена антигенна активність. Тому основоположна задача у боротьбі з лейкозом полягає у своєчасній діагностиці інфікованих тварин, їх ізоляції та вибракуванні з послідуючим формуванням стада здорових тварин [1, 2]. Відповідно до міжнародних стандартів сьогодні основними методами прижиттєвої діагностики вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) є реакція імунодифузії (РІД) та імуноферментний аналіз [3]. Широке використання РІД на практиці дозволило підвищити ефективність системи оздоровчих заходів проти лейкозу великої рогатої худоби у порівнянні з системою, заснованою лише на використанні клінічної діагностики та гематологічних методів [4].

Для постановки РІД використовується антиген ВЛ ВРХ, який виділяють з надосадової рідини при культивуванні перещеплюваної культури клітин фолікулярної лімфоми ембріональної нирки вівці (fetal lamb kidney bovine leukemia virus (FLK-BLV), хронічно інфікованої вірусом лейкозу ВРХ [5]. Першочерговою задачею для виробництва діагностичних препаратів є отримання значної кількості антигенвміщуючого матеріалу. Це можливо в разі підвищення експресії ВЛ ВРХ у перещеплюваній культури клітин FLK-BLV за рахунок додавання стимулюючих речовин до поживного середовища [6].

Для репродукції ВЛ ВРХ у хронічно інфікованих перещеплюваних лініях клітин в якості обов'язкової складової частини поживного середовища використовують 10–20 % сироватки крові ембріонів корів або спеціально відібраної сироватки крові новонароджених телят, а також їх суміш, сироватку крові овець, коней та ін. за даними [7]. Зниження вмісту ембріональної сироватки у поживному середовищі з 10 % до 5 % або 2 % призводить до зниження продукції вірусу на 40 % та 80 % відповідно. Використання інших сироваткових домішок можете бути більш ефективне. За даними літератури [8] максимальний врожай вірусного антигену (0,372 мг/мл) був отриманий в культурі FLK-BLV з використанням сироватки крові коней. Використання в якості добавки до поживного середовища для культивування віруспродукуючих ліній клітин суміші сироваток, яка складається з 1–3 % сироватки ембріонів корів та 7–9 % обробленої поліетиленгліколем (агаммаглобулінової) сироватки ВРХ, дозволяє не тільки отримати високоактивні препарати антигена, але й знизити витрати та уникнути негативного впливу антитіл до ВЛ ВРХ.

У роботах багатьох авторів для стимуляції продукції ВЛ ВРХ культурами лейкоцитів використовували фітогемагглютинін (ФГА) і конканавалін (КонА), які відносяться до мутагенів Т-лімфоцитів. У багатьох випадках під впливом ФГА в оптимальній концентрації синтез білків і продукція віріонів культурами лімфоцитів сильно зростали, причому, як відмічають Кукайн Р. А. та співав. (1982), результати у однієї і тієї ж тварини відтворювались під час повторних обстежень [9].

Інсулін проявляє стимулюючий ефект на транспорт глюкози та нейтральних амінокислот (аланін, серин, цистеїн, лейцин), активізує метаболізм глюкози та біосинтез нуклеїнових і жирних кислот, стимулює проліферацію клітин *in vitro*. Вплив сполук, які збільшують проникнення вірусу у клітини показав, що вирощування хронічно інфікованих ВЛ ВРХ перещеплюваних культур FLK-BLV на середовищі, яке вміщує 1 % ДМСО, супроводжувалося підвищення продукції вірусу. Додавання 1 % ДМСО у поживне середовище сприяло переходу клітин у щільному моношарі з непродуктивного у продуктивний стан. У результаті підвищувалась інтенсивність реплікації вірусу та продукція глікопротеїдного антигену, а також їх тривалість у порівнянні з контролем [10].

Останнім часом нанотехнологія стала однією з найбільш перспективних областей знань. Під терміном «наночастка» розуміється об'єкт, у якого розмір знаходиться в діапазоні від 1 до 100 нм [11]. Наночастки (НЧ) характеризуються високо розвинутою активною поверхнею. Завдяки активності та своїм розмірам, наночастки можуть наближатися до клітини, взаємодіяти з рецепторами на її поверхні та проникати у цитоплазму [12]. При переході речовини з макророзміру до розміру, що усього на один-два порядки більше молекулярного, різко змінюються її властивості – зі збільшенням питомої поверхневої енергії змінюється поверхневий натяг речовини, температура плавлення, може змінюватися сама структура, електронні характеристики, тобто увесь спектр фізико-хімічних властивостей, що був притаманний для речовин у макростані [13].

Найбільший інтерес представляють дослідження біологічної дії наночасток металів, так як вони частіше виступають об'єктом прикладних розробок в різних сферах промисловості та медицини. За останнє десятиліття зібрані дані як про позитивний (лікувальний ефект), так і про негативний (стимуляція виникнення різних захворювань) вплив НЧ металів на живі організми. Останнім часом найбільш активно досліджуються наночастки Арґентуму завдяки тому, що вони використовуються у виробництві різних товарів широкого споживання – харчових добавок, лікарських засобів, побутової техніки та ін. [14].

У зв'язку з цим **метою** роботи було вивчення впливу наночасток Арґентуму на антигенпродукуючу активність двох субліній перещеплюваної культури клітин FLK-BLV: FLK-SBBL та FLK-71 – продуцентів антигену для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби.

**Матеріали та методи.** У дослідженні були використані наночастки Арґентуму (Ag) розміром (31,5 ± 0,9) нм, які являли собою колоїдну дисперсію. Наночастки були синтезовані конденсаційним методом (хімічним) у вигляді колоїдних (водних) дисперсій та мали сферичну форму. За результатами попередніх досліджень впливу нанометалів на мітотичну активність та досліду цитотоксичності на сублінії FLK-BLV, було встановлено, що наночастки Арґентуму в розведенні 1:100 (вихідна концентрація 432,0 мкг/мл за металом) за весь час досліджень культивування клітин FLK-BLV не виявляли цитотоксичного ефекту, а показник мітотичної активності під їх дією за увесь експеримент був на рівні контролю або перевищував його. Тому для вивчення впливу нанометалів на антигенпродукуючу активність двох субліній FLK-BLV вибрали наночастки Ag у розведенні 1:100, та для порівняння препарат «Інсулін» у дозі 2 од/см$^3$.

У дослідженні 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».

Для проведення дослідження було сформовано для кожної клітинної субліній 1 контрольна та 2 дослідні групи:

1. Контрольна група: клітини субліній FLK-SBBL, поживне середовище.
2. Перша дослідна група: клітини субліній FLK-SBBL, поживне середовище з наночастками Ag 1:100.
3. Друга дослідна група: клітини субліній FLK-SBBL, поживне середовище з препаратом «Інсулін» у дозі 2 од/см$^3$.

Схема дослідження антигенпродукуючої активності FLK-71:

1. Контрольна група: клітини субліній FLK-71, поживне середовище.
2. Перша дослідна група: клітини субліній FLK-71, поживне середовище з наночастками Ag 1:100.
3. Друга дослідна група: клітини субліній FLK-71, поживне середовище з препаратом «Інсулін» у дозі 2 од/см$^3$.

Для дослідження антигенпродукуючої активності клітин під впливом наночасток Арґентуму в розведенні 1:100 та препарату «Інсулін» культури FLK-SBBL на 35 пасажі та FLK-71 на 25 пасажі висівали у культуральні матраци площею 25 см$^3$ – 4 матраци на кожний варіант. 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 $^0$ С в умовах термальної кімнати. На клітини у стадії активного росту вносили окремо наночастки Арґентуму 1:100 та препарат «Інсулін» у дозі 2 од/см$^3$. Пересів культур клітин проводили по мірі виповнення моношару, у середньому кожні 3–4 доби.

Для дослідження віруспродукуючої активності експериментальних і контрольних груп культури клітин FLK-SBBL та FLK-71 на рівні 8 послідовних пасажів зі збірної проби культуральної рідини об'ємом 12 літрів кожна виготовляли антигени ВЛ ВРХ для реакції імунодифузії в агаровому гелі.

Отриману культуральну рідину кожної групи перевіряли на стерильність бактеріологічними методами [15], піддавали 2-разовій дефростації. Зразки антигена ВЛ ВРХ концентрували, використовуючи форсований діаліз крізь напівпроникну мембрану проти 50 %-вого розчину поліетиленгліколю (ПЕГ 6000).

Кінцевим продуктом, який піддавали тестуванню на специфічність та активність в РІД методом граничних розведень з використанням контрольних позитивної та негативної діагностичних сироваток, був концентрований у такий спосіб антиген, ресуспендований у забуференому фосфатно-сольовому фізіологічному розчині, pH (7,0–7,2).

При постановці РІД використовували комерційні набори тест-системи «Набір компонентів для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» (м. Харків).

Для визначення титру отриманих антигенів готували послідовні розведення 1:1,5; 1:2; 1:2,5; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6. Позитивним титром антигену вважали розведення, за якого в РІД спостерігали чітку лінію преципітації з позитивною контрольною сироваткою не менш, ніж на два хрести (++). З метою порівняння активності отриманих антигенів підраховували кінцевий вихід антигену з 1 дм$^3$ культуральної рідини. Для цього користувалися терміном «робочий титр антигену», за який вважали таке розведення антигену, при якому позитивна реакція з позитивною сироваткою була на ++++. Для розрахунку кінцевого виходу антигену за 1 дм$^3$ культуральної рідини (Х) використовували формулу (1):

$$X = \frac{V1 \times [A] \times T}{V2} \times 100, \qquad (1)$$

де Х – кількість отриманого антигену з 1 дм$^3$ культуральної рідини, тис. доз;

$V_1$ – об'єм фактично отриманого антигену, см$^3$;

[А] – ступінь концентрації отриманого антигену;

Т – робочий титр отриманого антигену;

$V_2$ – об'єм культуральної рідини, використаний для виготовлення антигену;

100 – коефіцієнт для перерахунку в тис. доз.

**Результати досліджень.** Додавання до поживного середовища наночасток Арґентуму 1:100 при культивуванні культури клітин FLK-SBBL призвело до підвищення титру виготовлених антигенів 1:6 (рис. 1) порівняно з контролем, який складав 1:3 (рис. 2).

Додавання наночасток Арґентуму 1:100 до поживного середовища при культивуванні культури клітин FLK-71 призвело до підвищення титру антигену у 2 рази – 1:4 (рис. 3) порівняно з контрольним тиром 1:2 (рис. 4).

Результати дослідження активності отриманих антигенів FLK-SBBL наведено у табл. 1. Вихід антигену культури клітин FLK-SBBL під впливом наночасток Ag 1:100 збільшувався у 2 рази у порівнянні з контролем (4,00 та 2,00 тис. доз відповідно). Додавання препарату «Інсулін» підвищувало активність до 1:4 та вихід антигену до 2,50 тис. доз.

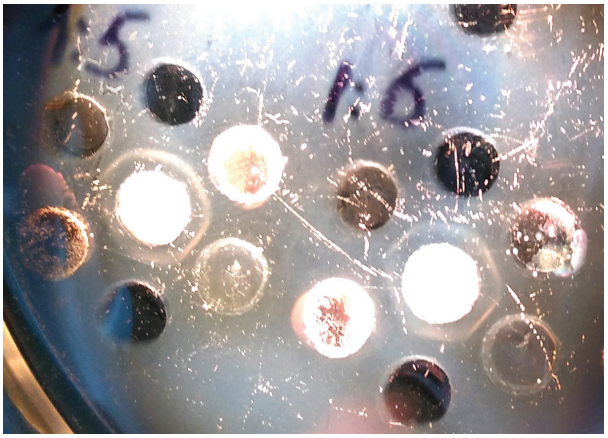


**Рис. 1.** Активність антигену культури клітин FLK-SBBL під впливом наночасток Арґентуму 1:100 у реакції імунодифузії (РІД)

**Рис. 2.** Активність антигену культури клітин FLK-SBBL (контроль) у реакції імунодифузії (РІД)

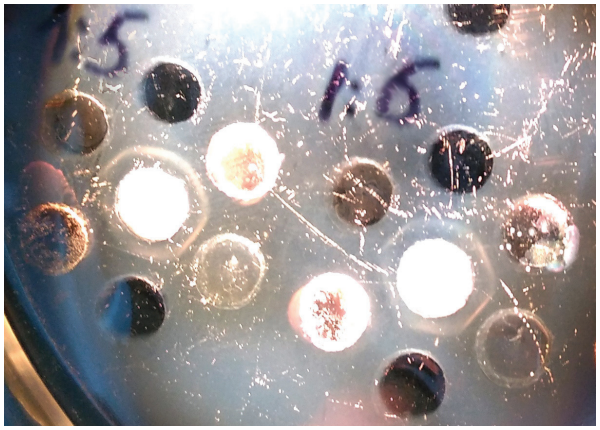


**Рис. 3.** Активність антигену культури клітин FLK-71 під впливом наночасток Арґентуму 1:100 у реакції імунодифузії (РІД)

**Рис. 4.** Активність антигену культури клітин FLK-71 (контроль) у реакції імунодифузії (РІД)

Результати дослідження активності отриманих антигенів FLK-71 наведено у табл. 2. Слід відмітити, що об'єм фактично отриманого антигену з додаванням до культури наночасток Ag 1:100 складав 80 $см^3$, що значно перевищувало показник контрольного варіанту (50 $см^3$). Препарат «Інсулін» викликав збільшення титру антигену у порівнянні з контролем (1:3 та 1:2 відповідно). Додавання препарату в дозі 2 од/$см^3$ до поживного середовища не впливало на рівень виходу антигену – цей показник контрольного варіанту та варіанту з додаванням препарату «Інсулін» був однаковий та становив 1,50 тис. доз.

**Таблиця 1** – Активність антигенів, отриманих після культивування культури клітин FLK-SBBL з додаванням до поживного середовища наночасток Арґентуму 1:100 та препарату «Інсулін», у реакції імунодифузії (РІД)

| | Титр антигену | Робочий титр | Об'єм фактично отриманого антигену, см$^3$ | Вихід антигену, тис. доз |
|---|---|---|---|---|
| Контроль культури | 1:1,5 ++++<br>1:2 ++++<br>1:2,5 +++<br>1:3 ++ | 1:2 | 50 | 2,00 |
| Ag 1:100 | 1:1,5 ++++<br>1:2 ++++<br>1:2,5 ++++<br>1:3 ++++<br>1:4 ++++<br>1:5 +++<br>1:6 ++ | 1:4 | 50 | 4,00 |
| Інсулін | 1:1,5 ++++<br>1:2 ++++<br>1:2,5 ++++<br>1:3 +++<br>1:4 ++ | 1:2,5 | 50 | 2,50 |

**Таблиця 2** – Активність антигенів, отриманих після культивування культури клітин FLK-71 з додаванням до поживного середовища наночасток Арґентуму 1:100 та препарату «Інсулін», у реакції імунодифузії (РІД)

| | Титр антигену | Робочий титр | Об'єм фактично отриманого антигену, см$^3$ | Вихід антигену, тис. доз |
|---|---|---|---|---|
| Контроль культури | 1:1,5 ++++<br>1:2 +++ | 1:1,5 | 50 | 1,50 |
| Ag 1:100 | 1:1,5 ++++<br>1:2 ++++<br>1:2,5 ++++<br>1:3 +++<br>1:4 +++ | 1:2,5 | 80 | 2,50 |
| Інсулін | 1:1,5 ++++<br>1:2 +++<br>1:2,5 +++<br>1:3 ++ | 1:1,5 | 40 | 1,50 |

**Висновки.** 1. Під час вивчення впливу наночасток Ag 1:100 на віруспродукуючу активність встановлено, що їх додавання позитивно впливає на морфологічний стан клітин, які зберігають типову веретеноподібну форму без виникнення вакуолізацій, нашарувань детриту із загиблих клітин протягом усього терміну дослідження (8 послідовних пасажів).

2. Встановлено, що під впливом наночасток Арґентуму 1:100 підвищувався титр отриманих антигенів у сублініях клітин FLK-SBBL та FLK-71 у порівнянні з контролем. Також доведено, що наночастки Ag 1:100 викликали підвищення виходу антигену у культурі клітин FLK-SBBL вдвічі порівняно з контролем (4,00 та 2,00 тис. доз відповідно).

3. У культурі клітин FLK-71 вихід антигену під впливом наночасток Ag 1:100 підвищувався до 2,50 тис. доз, тоді як в контролі він становив 1,50 тис. доз. Об'єм фактично отриманого антигену з додаванням наночасток Ag 1:100 до культури FLK-71 складав 80 см$^3$, що значно перевищувало показник контрольного варіанту (50 см$^3$).

4. Виявлено, що препарат «Інсулін» у дозі 2 од./см$^3$ поживного середовища посилював проліферацію клітин FLK-BLV, прискорював термін виповнення моношару та підвищував продукцію антигенів. Додавання препарату «Інсулін» до культури FLK-SBBL підвищувало активність антигену до 1:4 та вихід до 2,50 тис. доз. Рівень виходу антигену в контролі FLK-71 та з додаванням препарату «Інсулін» був однаковий, і становив 1,50 тис. доз.

*Список літератури*

1. Петропавловский М. В. Эффективность диагностических тестов в выявлении вируса лейкоза крупного рогатого скота в оздоравливаемых от лейкоза стадах [Текст] : автореф. дис... канд. вет. наук: 06.02.02 / М. В. Петропавловский. – Екатеринбург, 2010. – 23 с.
2. Апалькин В. А. Лейкоз крупного рогатого скота [Текст] / В. А. Апалькин, М. И. Гулюкин, Н. И. Петров. – СПб : Петролазер, 2005. – 106 с.
3. Повышение экспрессирующей способности перевиваемой культуры клеток FLK-BLV - продуцента антигена для диагностики лейкоза КРС [Текст] / С. К. Горбатенко, М. Ю. Стегний, А. Н. Корнейков, О. В. Шаповалова // Ветеринария и кормление. – 2014. – № 3. – С. 16-17.
4. Авилов В. М. Проблема оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза [Текст] / В. М. Авилов, В. М. Нахмасон // Ветеринария. – 1995. – № 11. – С. 3-6.
5. Двоеглазов Н. Г. Оценка эффективности различных методов діагностики инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст]: дис… канд. вет. наук: 16.00.03 / Н. Г. Двоеглазов. – Новосибирск, 2009. – 126 с.
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. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) [Текст] / Под общ. ред. проф. Дьяконова Л. П. – Москва : Спутник+, 2009. – 656 с.
8. Михалева Е. А. Сравнительная характеристика различных лабораторных систем культивирования вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст]: дис... канд. биол. наук / Е. А. Михалева. – ВИЭВ. – Москва, 1987. – 183 с.
9. Вирус лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Под ред. Р.А. Кукайн и Л.И. Нагаевой. – Рига, «Зинатне», 1982. – 175 с.
10. Крикун В.А. Лейкоз крупного рогатого скота (биологические свойства возбудителя, особенности распространения и меры борьбы) [Текст]: автореф. дис… д-ра вет. наук / В. А. Крикун. – М., 1999. – 50 с.
11. Approaches to safe nanotechnology. Managing the health and safety concerns associated with engineered nanomaterials [Text]. – DHHS (NIOSH) publication №.009-125. – 104 p.
12. Влияние наночастиц и ионов металлов на выживаемость и пролиферацию стволовых клеток человека in vitro [Текст] / А. Е. Папуга, [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 225-229.
13. Seaton A. Nanotechnology and the occupational physician [Text] / A. Seaton // Occupational medicine. – 2006. – Vol.56, № 5. – Pp. 312-316.
14. Наночастицы серебра индуцируют процессы перекисного окисления липидов и морфологические изменения поверхности лимфоцитов человека [Текст] / Е. В. Жорник [и др.] // Биофизика. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 466-473.
15. ДСТУ 4483:2005. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначання бактеріальної і грибної контамінації [Текст] : чинний з 2005-11-25. — К. : Держспоживстандарт України, 2006. – III – 20 с. – (Національний стандарт України).

## STUDY OF THE EFFECT SILVER NANOPARTICLES ON THE LONG-TERM CELLS CULTURE FLK-BLV ANTIGEN PRODUCTIVE ACTIVITY

***Stegniy M. Yu., Magats D. Yu.***

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

*The article observes capability of the use silver nanoparticles to stimulate the expression leukemia virus and antigen producing activity. Antigen producing activity was determined after the adaptation period in the 8 passages by RID. The activity of the experimental antigen produced on nutrient medium with the addition of the silver nanoparticles 1:100 was 1:6 compared to controls (1:3).*

***Keywords:*** *long term cell culture FLK-BLV, nanoparticles, bovine leukemia virus, nanoparticles, radial immunodiffusion*