

## ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІНГІБИТОРУ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГІСТОНІВ НА АНТИГЕНПРОДУКУЮЧУ АКТИВНІСТЬ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ FLK-BLV

Шаповалова О.В., Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., М'яжгих Н.В., Коновалов А.В., Дуднік В.О., Десятніков Л.О.

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

У наш час основними методами прижиттєвої діагностики лейкозу великої рогатої худоби та контролю благополуччя поголів'я залишаються імунологічні (РІД та ІФА) та молекулярно-генетичні (виявлення ДНК провірусу та РНК вірусу в ПЛР) [1, 2] методи. Забезпечення високого рівня діагностичної ефективності імунологічних методів залежить від застосування високоспецифічного антигену gp51 ВЛКРС. Оскільки антиген ВЛВРХ, який використовують з діагностичною метою, продукується лініями клітин, хронічно інфікованими збудником лейкозу (FLK-BLV або PO714), на його якість впливає багато біотехнологічних чинників. Однією з найважливіших характеристик ліній клітин, що продукують ВЛВРХ, є здатність синтезувати велику кількість вірусу та його антигену. З літературних джерел відомі численні спроби підвищити продукцію вірусу у культурі FLK-BLV шляхом підбору оптимального складу поживних середовищ, застосування гормональних препаратів, тощо [2, 3]. Однак біологічні властивості застосованих вірус-продуруючих систем обумовлюють необхідність проведення нових досліджень з цього питання.

Перспективним є напрямок з використанням молекулярно-генетичних механізмів впливу на розмноження вірусу. Повідомляється про спроби підвищити продукцію антигену ВЛВРХ в лініях клітин за рахунок додаткової експресії гену *tax* та продукту цього гену-білку *Tax*, одним з механізмів збільшення продукції якого є епігенетичні модифікації гену *tax*, такі як ацетилювання гістонів [4]. Одним із способів підвищення рівня ацетилювання є застосування деацетилаз гістонів, серед яких найбільш перспективним є вальпроат натрію. Стимулюючий ефект вальпроату натрію на експресію ВЛВРХ був показаний в експериментах *in vitro* та *in vivo* [5-7].

У доступній літературі ми не знайшли повідомлень про дослідження впливу даного препарату на лімфоцити ВРХ та перещеплювані лінії клітин, що продукують ВЛВРХ. Однак, у наших попередніх пошукових досліджах було встановлено, що вальпроат натрію у кінцевій концентрації 0,5 мМ не має негативного впливу на життєздатність короткостроково культивованих лімфоцитів ВРХ, інфікованої ВЛВРХ, та втричі підвищує експресію вірусу у лімфоцитах, культивованих з додаванням препарату, у порівнянні з нативними лімфоцитами та лімфоцитами, культивованими без додавання вальпроату натрію [8]. Це вказує на доцільність проведення випробувань даного препарату в якості стимулятора продукції ВЛВРХ та його антигенів в культурі клітин, хронічно інфікованих вірусом лейкозу.

У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчення впливу інгібітору деацетилаз гістонів натрію вальпроату на антиген-продукуючі властивості перещеплюваної культури клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфікованої вірусом лейкозу великої рогатої худоби (FLK-BLV).

**Матеріали і методи.** Для експериментів використовували перещеплювану культуру клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфіковану вірусом лейкозу великої рогатої худоби (FLK-BLV), яку вирощували за загальноживними методиками ведення культуральних досліджень. Засів клітин проводили у стерильні флакони об'ємом 50-100 см<sup>3</sup> та бактеріологічні пробірки з покривними скельцями з концентрацією 100-300 x 10<sup>3</sup> клітин/см<sup>3</sup> поживного середовища, яке вміщувало 45 % середовища Ігла, 45 % середовища 199, 10 % нативної сироватки ВРХ, пеніцилін 100 ОД/см<sup>3</sup> та гентаміцин 40 мг/см<sup>3</sup>, за температури 37°C в умовах термостату. Пересів культури виконували по мірі виповнення моношару, в середньому кожні 5-6 діб. Культуральну рідину, отриману після кожного пасажу, у вигляді збірної проби піддавали дворазовому заморожуванню-відтаюванню за температури мінус 18 °С.

Для вивчення антигенстимулюючої дії вальпроату натрію (ВН) препарат додавали у різних концентраціях до поживного середовища для культивування клітин FLK-BLV. Кінцеві концентрації склали 0,5; 1,0; 5,0 та 10,0 мМ.

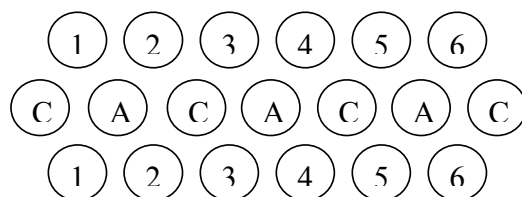
Оцінку впливу вальпроату натрію на морфологічні властивості клітин та швидкість формування моношару культури FLK-BLV проводили методом мікроскопії зафіксованих і забарвлених клітин, які вирощувались на покривних скельцях. Спостереження проводились за допомогою світлового мікроскопа щоденно в динаміці пасажування з додаванням різних концентрацій препарату. В якості контролю використовували культуру клітин FLK-BLV без додавання препарату.

Для дослідження антигенпродуруючих властивостей експериментальної та контрольної культури клітин FLK-BLV на рівні кожного пасажу зі збірної проби культуральної рідини виготовляли антигени ВЛВРХ для реакції імунодифузії (РІД). Для цього отриману культуральну рідину освітлювали шляхом низькошвидкісного центрифугування з послідовним концентруванням до 1/100 від первинного об'єму за допомогою розподільного апарату з порожнистими волокнами та ПЕГ 6000. Сконцентрований в такий спосіб антиген далі ресуспендували у фосфатно-сольовому фізіологічному розчині, рН 7,0-7,2. Активність антигену оцінювали серологічним методом граничних розведень в реакції імунодифузії (РІД) з використанням контрольної позитивної діагностичної сироватки з «Набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» за ТУУ 24.4. – 00497087-647-2002. Постановку реакції і облік результатів проводили згідно «Листівки-вкладки до набору компонентів для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії» (№ 3272-14-0525-04/08-1/0 від 18.03.08) у 2 повторях на чашках Петрі з використанням прямокутного штампку (рис. 1). Для визначення кінцевого титру готували послідовні розведення експериментальних серій антигенів від нативного до 1:8. В якості розчинника антигенів використовували фосфатно-сольовий фізіологічний розчин, рН 7,0-7,2.

Компоненти реакції вносили у лунки агару в об'ємі 40 мкл (схема 1).

- 1 лунка - дослідний антиген, нерозведений;
- 2 лунка – дослідний антиген у розведенні 1:2;
- 3 лунка - дослідний антиген у розведенні 1:3;
- 4 лунка - дослідний антиген у розведенні 1:4;
- 5 лунка - дослідний антиген у розведенні 1:5;
- 6 лунка - дослідний антиген у розведенні 1:6;

Якщо титр антигену перевищував 1:6, готували необхідні додаткові розведення антигену для виявлення його максимальної активності.



**Рис. 1** Схема заповнення лунок контрольною сироваткою (С), дослідним антигеном (А) та його послідовними розведеннями (1-6).

**Результати досліджень.** Проведені експерименти показали, що кінцевий титр та кінцевий вихід отриманих антигенів змінювались у залежності від дози внесеного ВН та кількості проведених послідовних пасажів в порівнянні з контролем.

Кінцевим титром антигену вважали розведення, при якому в РІД спостерігали чітку лінію преципітації з позитивною контрольною сироваткою на один +. Для порівняння активності виготовлених антигенів з експериментальною метою дані про їх кінцевий титр вважали достатніми. З метою порівняння активності отриманих антигенів для виробничого застосування необхідно було підрахувати кінцевий вихід антигену з 1 дм<sup>3</sup> культуральної рідини. Для цього використовували термін «робочий титр антигену», за який вважали таке розведення антигену, при якому спостерігали позитивну реакцію з позитивною контрольною сироваткою на +++, а при його подальшому 2-кратному розведенні результат реакції дорівнював ++.

Для розрахунку кінцевого виходу антигену з 1 дм<sup>3</sup> культуральної рідини (X) застосовували формулу:

$$X = \frac{V_1 \times [A] \times T}{V_2} \times 100, \text{ де}$$

X – кількість отриманого антигену з 1 дм<sup>3</sup> культуральної рідини, тис. доз;

V<sub>1</sub> – об'єм фактично отриманого антигену, см<sup>3</sup>;

[A] – ступінь концентрації отриманого антигену;

T – робочий титр отриманого антигену;

V<sub>2</sub> – об'єм культуральної рідини, використаний для виготовлення антигену;

100 – коефіцієнт для перерахунку в тис. доз.

При цьому розрахунки кінцевого виходу антигенів з 1 дм<sup>3</sup> культуральної рідини не проводили, якщо кінцевий титр антигену був нативним, і спостерігалася лінія преципітації з позитивною контрольною сироваткою лише на ++.

Розрахунки свідчать, що підвищення активності антигену характеризувалось двократним збільшенням виходу та робочого титру на рівні 1 пасажу з використанням 0,5 мМ та 1,0 мМ ВН у порівнянні з контролем та більш високими концентраціями препарату (табл.).

**Таблиця** – Активність антигенів з використанням ВН (РІД)

№ п/п	Антиген	Кінцевий титр	Робочий титр	Вихід антигену/дм <sup>3</sup> , тис. доз
1 пасаж				
1	0,5 мМ	1:8	1:2	2,00
2	1,0 мМ	1:6	1:2	1,99
3	5,0 мМ	1:5	нат.	1,00
4	10,0 мМ	1:2	нат.	0,99
5	контроль	1:5	нат.	1,00
2 пасаж				
6	0,5 мМ	1:4	нат.	1,00
7	1,0 мМ	1:4	нат.	0,99
8	5,0 мМ	-	-	-
9	10,0 мМ	Нат.	-	-
10	контроль	1:5	нат.	0,99
3 пасаж				
11	0,5 мМ	1:2	нат.	0,99
12	1,0 мМ	1:4	нат.	1,00
14	5,0 мМ	-	-	-
15	10,0 мМ	-	-	-
16	контроль	1:4	нат.	0,99
4 пасаж				
17	0,5 мМ	1:4	нат.	1,00
18	1,0 мМ	1:4	нат.	0,99
19	5,0 мМ	-	-	-
20	10,0 мМ	-	-	-
21	контроль	1:3	нат.	0,99
5 пасаж				
22	0,5 мМ	1:3	нат.	0,91
23	1,0 мМ	1:2	нат.	1,00
24	5,0 мМ	-	-	-
25	10,0 мМ	-	-	-
26	контроль	1:3	нат.	0,99

Також було встановлено, що концентрації ВН 5,0 мМ та 10,0 мМ вже на рівні 2 пасажу викликали негативні морфологічні зміни клітин (вакуолізація, зменшення розміру клітин та зміна типової форми, напластування та локальне руйнування моношару), що призвели до повної деградації моношару на 5 пасажі.

Навпаки, при дослідженні концентрацій ВН 0,5 мМ та 1,0 мМ протягом 14 пасажів у культурі спостерігали клітини типової подовженої веретеноподібної форми, відповідного розміру та розташування. Процеси вакуолізації були відсутні. На момент пересіву моношар виконувався на 90-100%, у ньому виявлялися зони росту.

На відміну від експериментальних флаконів, у контрольних флаконах без додавання ВН, ознаки старіння клітин моношару спостерігалися вже на 3-4 добу культивування, що морфологічно відображалось втратою типової подовженої форми клітин, вакуолізацією та локальним руйнуванням моношару.

**Висновки.** Інгібітор деацетилаз гістонів натрію вальпроат у концентраціях 0,5 мМ та 1,0 мМ на рівні 1 пасажу дворазово підвищує антигенпродукуючу активність перещеплюваної культури FLK-BLV, що виявляється в РІД з позитивною на лейкоз контрольною сироваткою.

Додавання натрію вальпроату до перещеплюваної культури клітин FLK-BLV у концентраціях 0,5 мМ та 1,0 мМ позитивно впливає на морфологічний стан клітин, які зберігають типову веретеноподібну форму без виникнення вакуолізації, напластувань, пустот у моношарі протягом 14 послідовних пасажів (термін спостережень).

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати обумовлюють проведення подальших досліджень з вивчення придатності антигенів, отриманих з використанням інгібіторів деацетилаз гістонів, для застосування в серологічних діагностичних дослідженнях на лейкоз.

### Список літератури

1. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу: – Затв. Державним комітетом ветеринарної медицини України 21.12.2007. – наказ N 21. - Видання офіц. – Київ, 2008.
2. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 2008. - ch. 2.4.11 Enzootic Bovine Leukosis. – P. 729-738. - <http://www.oie.int>.
3. Цитогенетическая характеристика и вируспродуцирующая активность сублиний FLK-BLV / А.А. Лаврик [и др.] // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. Збірник. - 2001. – Харків – № 79. – ч. 2. – С. 216-224.
4. Increase of antigen production in BLV-infected cell lines via additional expression of tax / H. J. Wagner [et al.] // Zentralbl Veterinarmed [B]. – 1995. – Vol. 42. – N 9. – P. 543-550.
5. Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo / A. Achachi [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2005. - Vol. 102. - No. 29. – P. 10309-10314.
6. Inhibition of Histone Deacetylases Induces Bovine Leukemia Virus Expression In Vitro and In Vivo / C. Merezak Achachi [et al.] // J. of Virol. - 2002. - Vol. 76. - N 10. – P. 5034-5042.
7. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet [et al.] // Retrovirology. – 2007. – Vol. 4, N 18. – 10.1186/1742-4690-4-18. - <http://www.retrovirology.com/content/4/1/18>.
8. Вивчення впливу інгібітору деацетилаз гістонів на експресію вірусу лейкозу великої рогатої худоби / О.В. Шаповалова [та інш.] // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. Збірник. - 2011. – Харків – № 95. – С. 86-87.

### STUDY OF THE EFFECT OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR ON THE FLK-BLV CONTINUOUS CULTURE ANTIGEN PRODUCTIVE ACTIVITY

*Shapovalova O.V., Gorbatenko S.K., Kuznetsova E.V., Myagkih N.V., Konovalov A.V., Dudnik V.A., Desyatnikov L.O.*

*NSC "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv*

*The effect of histone deacetylase inhibitor sodium valproate on the FLK-BLV continuous culture antigen productive activity has been studied. It was found that 0.5 and 1.0 mM of the drug induced the antigen yield and its activity twofold increase at the first passage, as well as positive effects on the cells monolayer' morphology at multiple passages.*