

Таблиця – Результати спектрофотометричного учета ИФА сывороток крови кроликов, иммунизированных различными микобактериями

Сыворотки кроликов, иммунизированных различными микобактериями	Титры антител, $K_{cn}$		
	Антигены микобактерий, используемые для сенсibilизации планшета		
	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> -8	<i>M. bovis</i> Vallee
<i>M. bovis</i> BCG	отриц.	1:1600, $K_{cn}=2,3$	1:3200, $K_{cn}=2,3$
<i>M. bovis</i> -8	1:3200, $K_{cn}=2,4$	1:3200, $K_{cn}=3,2$	1:3200, $K_{cn}=3,0$
<i>M. bovis</i> Vallee	1:1600, $K_{cn}=2,1$	1:3200, $K_{cn}=3,9$	1:3200, $K_{cn}=4,0$
<i>M. tuberculosis</i>	1:200, $K_{cn}=2,2$	1:3200, $K_{cn}=3,4$	1:3200, $K_{cn}=3,1$
<i>M. intracellulare</i>	1:3200, $K_{cn}=2,5$	1:3200, $K_{cn}=3,6$	1:3200, $K_{cn}=3,2$
<i>M. avium</i>	1:400, $K_{cn}=2,5$	1:800, $K_{cn}=2,5$	1:800, $K_{cn}=2,5$

Из данных таблицы следует, что полученные антигены микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Vallee позволяют проводить дифференциацию поствакцинальных и постинфекционных антител.

**Выводы.** 1. Получены антигены микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Vallee и установлена возможность их использования для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антител к возбудителю туберкулеза крупного рогатого скота.

2. Установлена специфичность полученных микобактериальных антигенов методом иммуноферментного анализа.

#### Список литературы

- Агеева, Т.Н. Корреляционная зависимость выявления в крови иммунных комплексов и микобактериальных антигенов с помощью ИФА и результатов бактериологической диагностики туберкулеза на среде ВКГ [Текст] / Т.Н. Агеева, А.П. Лысенко, Е.М. Красникова // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. – 2005. – № 2. – С. 39–42.
- Альфредо, Э. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* [Текст] / Э. Альфредо, В.И. Вершинина, К.С. Хаертынов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 1. – С. 18–22.
- Верховский, О.А. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулезе крупного рогатого скота [Текст] / О.А. Верховский, А.Х. Найманов, О.А. Савицкая // Актуальные пробл. инфекц. патологии и иммунологии животных; [ВНИИЭВ]. – М., 2006. – С. 180–184.
- Овдиенко, Н.П. Туберкулез как международная и национальная медико-ветеринарная проблема в современных условиях [Текст] / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко // Вет. врач. – 2009. – № 2. – С. 14–17.
- Шуралев, Э.А. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] / Э.А. Шуралев, Э.В. Ндаишимийе, М.Н. Мукминов // Уч. зап. КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 211. – С. 202–206.
- Якупов, Т.Р. Иммуноблот анализ в диагностике туберкулеза [Текст] / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертдинов // Вет. врач. – 2011. – № 1. – С. 29–31.
- Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / S. Diabougba [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1997. – Vol. 4, № 3. – P. 334–338.
- Laemmli, U.K. Cleavage structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 [Text] / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
- Roman, F. Deglycosylation of the 45/47 kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses [Text] / F. Roman, C. Horn, P. Pescher // Inf. Immun. – 1999. – Vol. 67, № 11. – P. 5567–5572.
- Wang, B.L. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients [Text] / B.L. Wang, Y. Xu, Z.M. Li // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2005. – Vol. 9, № 12. – P. 1327–1334.

### PREPARATION OF MYCOBACTERIAL ANTIGENS OF *M. BOVIS* BCG-1, *M. BOVIS*-8 AND *M. BOVIS* VALLEE FOR DIFFERENTIATION OF POST-VACCINATION AND POSTINFECTIOUS ANTIBODIES

*Khismatullina N.A., Khaertynov K.S., Shuralev E.A., Gulyukin A.M., Akhmadeev R.M.,*

*Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia*

*Naimanov A.Kh.*

*All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, Russia*

*A new method of M. bovis BCG-1, M. bovis-8, M. bovis Vallee antigens preparation is developed. The antigens allow differentiating postinfectious and post-vaccination antibodies to bovine tuberculosis pathogen. The specificity of mycobacterial antigens in ELISA is established.*

УДК 619:578:616.98:578.828.11

### ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕНПРОДУКУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН FLK-BLV ПІД ВПЛИВОМ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ

*Шаповалова О.В., Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., М'ягих Н.В.*

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

Підвищення виходу вірусу лейкозу ВРХ та його антигенів, які продукуються у перещеплюваних культурах клітин, є насущною потребою виробництва. Як відомо, одним з механізмів, що впливають на експресію інтегрованих вірусів, є оксидативний стрес [1]. А. Bondzio та співавтори показали, що у відповідь на короткострокову інкубацію з перекисом водню у низькій концентрації в хронічно інфікованих ВЛВРХ культурах клітин FLK-BLV 44-1 та BL 3.1 активується експресія вірусу лейкозу [2]. Крім того, експериментальними дослідженнями на культурі клітин було доведено, що транскрипційна відповідь BLV на інгібітор деацитилаз гістонів опосередковується активними формами кисню [3].

Виходячи з вказаного вище, метою нашої роботи було випробування активних форм кисню в якості стимулятора продукції антигену ВЛВРХ в перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби (FLK-BLV).

**Матеріали та методи.** Клітини FLK-BLV вирощували за загальножививними методиками. Засів клітин проводили у стерильні флакони об'ємом 50–500 см<sup>3</sup> і бактеріологічні пробірки з покривними скельцями з концентрацією 100–300 × 10<sup>3</sup> клітин/см<sup>3</sup> поживного середовища. Експеримент проводили з використанням двох варіантів поживного середовища. Поживне середовище № 1 складалось з 45 % середовища Ігла, 45 %

## Розділ 9. Біотехнологія

середовища 199, 10 % нативної сироватки ВРХ. Поживне середовище № 2 відрізнялось від першого вмістом 12–15 % сироватки ВРХ, звільненої від глобулінової фракції (аглобулінова сироватка). До середовищ обох типів додавали пеніцилін 100 ОД/см<sup>3</sup> і гентаміцин 40 мг/см<sup>3</sup>. Пересіви культури виконували послідовно після виповнення моношару.

Вплив активних форм кисню на віруспродукуючу активність перещеплюваної культури FLK-BLV вивчали на прикладі перекису водню у концентраціях (5–20) мкМ у поживному середовищі № 1 для культивування клітин FLK-BLV у режимі 4, 24, 72, 148 годин впливу та при послідовному пасажуванні. Поживне середовище № 2 з додаванням 10 мкМ перекису водню використовували в режимі послідовного пасажування культури клітин.

З метою встановлення погодинного впливу препарат у експериментальних концентраціях додавали на 2 добу культивування після виповнення моношару на 90–100 % з подальшим погодинним спостереженням за морфологічним станом клітин і відбором збірної проби культуральної рідини з флаконів кожної групи для отримання лейкозного антигену. При послідовному пасажуванні культури клітин перекис водню у вказаній концентрації додавали до ростового середовища безпосередньо під час пересіву. В якості контролю використовували культуру клітин FLK-BLV без додавання перекису водню. Усі культуральні дослідження проводили у трьох повторах.

Оцінку впливу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на морфологічні властивості клітин і швидкість формування моношару культури FLK-BLV проводили методом мікроскопії моношару у культуральних флаконах ємністю 500 см<sup>3</sup>, а також зафіксованих і забарвлених клітин, які вирощували на покривних скельцях. Спостереження проводили щоденно в динаміці пасажування з додаванням різних концентрацій препарату.

Антигени ВЛВРХ для реакції імунодифузії (РІД) виготовляли із збірних проб культуральної рідини експериментальної та контрольної культури клітин FLK-BLV, які концентрували до 1/100 від первинного об'єму. Активність антигенів вивчали серологічним методом граничних розведень в реакції імунодифузії (РІД) з використанням «Набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина». Для визначення кінцевого та робочого титрів готували послідовні розведення експериментальних серій антигенів у фосфатно-сольовому фізіологічному розчині, рН 7,0–7,2. Окрім цього в РІД проводили дослідження розведених антигенів та контрольної сироватки (КПС) відповідно.

Кінцевим титром антигену вважали розведення, при якому в РІД спостерігали чітку лінію преципітації з позитивною контрольною сироваткою на один +. Робочим титром антигену вважали таке розведення, при якому спостерігали специфічну реакцію з позитивною контрольною сироваткою на +++++, а при подальшому 2-кратному розведенні антигену результат реакції дорівнював ++.

**Результати досліджень.** При вивченні впливу перекису водню в концентраціях 5,0 мкМ, 10 мкМ та 20 мкМ препарату у режимі 4, 24, 72, 148 годин впливу та при послідовному пасажуванні протягом 6–7 діб з використанням поживного середовища № 1 було встановлено, що дані концентрації H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при вказаних експозиціях не викликали деструктивних морфологічних змін клітин і стану моношару культури FLK-BLV.

Показано, що 4- та 24-годинний вплив 5,0 мкМ, 10 мкМ та 20 мкМ перекису водню на виконаний моношар не змінював антигенпродукуючі властивості культури клітин. Кінцевий титр усіх виготовлених експериментальних і контрольного антигенних препаратів складав 1:2.

Додавання 5,0 мкМ перекису водню на виконаний моношар і контакт клітин моношару з препаратом упродовж 72 годин призвело до підвищення активності антигену, кінцевий титр якого досягав 1:6, а робочий – дорівнював 1:2, що вдвічі перевищувало робочий титр контрольного антигену. Інші концентрації перекису водню за умов 72-годинної експозиції суттєво не впливали на показники активності виготовлених антигенів.

Культивування клітин з різними концентраціями препарату протягом 6 діб не підвищувала кінцеві титри антигенів у порівнянні з контролем.

За отриманими результатами були відібрані оптимальні концентрації та режим експозиції перекису водню для подальших дослідів. Вони склали 5,0 мкМ та 10 мкМ, 72-годинне витримання при додаванні до повністю виконаного моношару, а також внесення препарату до ростового середовища безпосередньо. Дані про вплив оптимальних концентрацій препарату на антигенпродукуючі властивості культури FLK-BLV при послідовному пасажуванні наведені у таблиці 1.

**Таблиця 1** – Активність антигенів, отриманих з використанням поживного середовища № 1 та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при послідовному пасажуванні, РІД

№ п/п	Антиген, вміст H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Кінцевий титр	Робочий титр
1 пасаж			
1	Дослід, 5, 0 мкМ	1:8	1:3
2	Дослід, 10,0 мкМ	1:6	1:2
3	Контроль	1:7	1:3
2 пасаж			
4	Дослід, 5, 0 мкМ	1:7	1:2
5	Дослід, 10,0 мкМ	1:7	1:3
6	Контроль	1:7	1:2
3 пасаж			
7	Дослід, 5, 0 мкМ	1:6	1:2
8	Дослід, 10,0 мкМ	1:7	1:3
9	Контроль	1:7	1:2

З наведених результатів видно, що з кожним наступним пасажом додавання перекису водню в концентрації 10 мкМ сприяло підвищенню робочого титру антигену в порівнянні з концентрацією 5,0 мкМ і контролем. Опираючись на отримані результати, для подальших дослідів було обрано концентрацію перекису водню 10 мкМ.

Вивчення активності антигенів, отриманих з використанням поживного середовища № 2 з вмістом 10 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у режимі послідовного пасажування культури клітин показали, що дослідні антигени, отримані на рівні I та II пасажів, були більш активними. Для оцінювання інтенсивності прояву реакції проводили дослідження з контрольною позитивною сироваткою (КПС), розведеною до титру 1:6 (таблиця 2).

Як свідчать дані, наведені в таблиці 2, інтенсивність прояву реакції преципітації в порівнянні з контролем була вищою з дослідними антигенами, які були отримані на рівні I та II пасажів. Це було характерно для нативних антигенів і розведених до титру 1:2. До III пасажу активність дослідного антигену, на відміну від контрольного, значно знизилась.

Також з III пасажу в даній серії експериментів з використанням поживного середовища № 2 почав проявлятися негативний вплив перекису водню на морфологічні характеристики моношару культури клітин FLK-BLV. Якщо на рівні II пасажу в обох групах флаконів з дослідною та контрольною культурою клітин морфологія моношару була ідентичною (клітини були округлими, дрібними, з великою кількістю включень, дуже щільно прилягали одна до одної і місцями утворювали напластування), то на момент III пасажу в 60 % дослідних флаконів моношар було зруйновано на 90–100 %. У решті дослідних ємностей, у порівнянні з контролем, моношар виглядав більш щільним, з напластуваннями. Клітини мали в більшості нетипову, округлу форму з великою кількістю вакуолей та включень.

**Таблиця 2 –** Активність антигенів, отриманих з використанням поживного середовища № 2 та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при послідовному пасажуванні, РІД

АГ, титр	КПС, титр					
	Нативна	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Дослід I пасаж						
Нативний	++++	++++	+++	-	-	-
1:2	++++	++++	+++	+	-	-
1:3	+	+	+	+	-	-
1:4	-	+	+	+	+	-
Контроль I пасаж						
Нативний	++++	++++	+++	-	-	-
1:2	++++	++++	+++	сліди	сліди	сліди
1:3	+	+	+	-	-	-
1:4	+	+	+	+	+	+
Дослід II пасаж						
Нативний	++++	++++	++++	+	+	+
1:2	+++	+++	+++	++	++	++
1:3	сліди	сліди	сліди	++	++	++
1:4	-	-	-	-	-	-
Контроль II пасаж						
Нативний	++++	++++	++++	+	+	+
1:2	++	++	++	+	+	+
1:3	сліди	сліди	сліди	++	++	++
1:4	-	-	-	-	-	-
Дослід III пасаж						
Нативний	++++	++++	++	+	+	+
1:2	+	++	++	+	-	-
1:3	+	++	++	+	+	+
1:4	-	-	-	-	-	-
Контроль III пасаж						
Нативний	++++	++++	++	-	-	-
1:2	+++	+++	+++	+	-	-
1:3	++	+++	+++	+	+	-
1:4	-	-	+	-	-	-

**Висновки.** 1. При використанні поживного середовища з нативною сироваткою крові ВРХ внесення перекису водню на 2-добовий виконаний моношар перещеплюваної культури клітин FLK-BLV у концентрації 5,0 мкМ з експозицією 72 години призводить до дворазового підвищення активності лейкоспецифічного антигену у порівнянні з контролем. При послідовному пасажуванні з 10 мкМ перекису водню активність та вихід лейкозного антигену для РІД збільшуються в 1,5 рази. Деструктивні морфологічні зміни клітин і стану моношару культури FLK-BLV під дією перекису водню не спостерігаються.

2. При використанні поживного середовища з аглобуліновою сироваткою в режимі послідовного пасажування перещеплюваної культури клітин FLK-BLV з 10 мкМ перекису водню активність антигену для РІД підвищується на рівні I та II пасажів. З III пасажу відбувається руйнування моношару клітин, як наслідок впливу перекису водню.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати вказують на можливість проведення подальших досліджень впливу перекису водню на антигенпродукуючі властивості культури клітин FLK-BLV у виробничих умовах з використанням середовища № 1, яке складалось з 45 % середовища Ігла, 45 % середовища 199, 10 % нативної сироватки ВРХ.

*Список літератури*

1. Kurata, S. Sensitization of the HIV-1-LTR upon Long Term Low Dose Oxidative Stress [Text] / S. Kurata // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, № 36. – P. 21798–21802.
2. Bondzio, A. Effects of hydrogen peroxide on bovine leukemia virus expression [Text] / A. Bondzio, P. Blankenstein, S. Risse // Biol. Chem. – 2003. – Vol. 384, № 7. – P. 1063–1072.
3. Kawai, Y. Valproic acid-induced gene expression through production of reactive oxygen species [Text] / Y. Kawai, I. J. Arinze // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66, № 1. – P. 6563–6569.

#### STUDIES ON THE FLK-BLV PASSAGED CELL CULTURE' ANTIGEN PRODUCTION ACTIVITY UNDER THE REACTIVE OXYGEN EFFECT

*Shapovalova O.V., Gorbatenko S.K., Kuznetsova O.V., Myagkih N.V.*

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

*The effect of hydrogen peroxide on the FLK-BLV passaged cell culture antigen production activity has been studied. It was found that 5,0 and 10,0 μM of the drug induced the 1,5–2,0-fold antigen activity increase depending on the cultivation method.*