

УДК 576.851.132:616.982.27-033 К-69

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ АНТИГЕНОВ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Пименова Е.В., Храпова Н.П.

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
Волгоград, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru;

ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: post@volgmed.ru

В работе обобщены результаты применения перевиваемых клеточных линий животного происхождения: L929 – фибробласты мышцы и CHO-K1 – овариальные клетки китайского хомячка (клон линии CHO) для качественной и количественной оценки биологической активности растворимых антигенов *B. pseudomallei* в тесте микроцитотоксичности *in vitro*. Получены достоверные доказательства эффективности использования этих монослойных культур в качестве индикаторных мишеней *in vitro* взамен общепринятому методу с использованием лабораторных животных. Альтернативный метод – информативный, воспроизводимый и экономичный способ выявления токсичных компонентов в различных образцах антигенов *B. pseudomallei*. В настоящей публикации отражены особенности работы с паспортизированными клеточными линиями, вопросы их подготовки к основным экспериментам по оценке токсичности исследуемых образцов антигенных комплексов *B. pseudomallei*, а также разнообразие возможностей их применения в зависимости от конкретных целей исследования.

Ключевые слова: мелиоидоз, антигены, перевиваемые клеточные линии, тест микроцитотоксичности

STUDY OF POTENTIAL CYTOTOXICITY OF ANTIGENS COMPLEX BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ON MODEL OF CONTINUOUS CELL CULTURES

Pimenova E.V., Khrapova N.P.

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru;

Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: post@volgmed.ru

The paper summarizes the results of the use of continuous cell lines of animal origin: L929 – mouse fibroblasts, and CHO-K1 – ovarian cells of Chinese hamster (CHO clone) for the qualitative and quantitative evaluation of the biological activity of soluble antigens of *B. pseudomallei* microcytotoxicity the test *in vitro*. Received credible evidence of the effectiveness of the use of these monolayer cultures as indicator targets *in vitro* instead of the conventional method of using laboratory animals. Alternative method – informative, reproducible and cost-effective way to identify the toxic components in various samples of antigens of *B. pseudomallei*. This publication reflects the peculiarities of working with certify cell lines, questions to prepare them for basic experiments to evaluate the toxicity of the test samples of antigenic complexes of *B. pseudomallei*, as well as a variety of possibilities for their application depending on the specific objectives of the study.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, continuous cell lines, test mikrocytotoksichnost

Для оценки потенциально токсичных биологических и химических веществ в настоящее время широко используют метод клеточной биоиндикации взамен общепринятой модели *in vivo*. Определение потенциальной токсичности антигенов возбудителей опасных инфекционных заболеваний *in vitro* на модели перевиваемых клеточных линий – чувствительный, простой в исполнении и информативный тест, который можно использовать на этапах лабораторного анализа различных внеклеточных или ассоциированных с клеточными структурами биополимеров. Установлено, что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [6, 10].

Одним из важнейших преимуществ применения клеточных культур является возможность прижизненного наблюдения

за результатами взаимодействия компонентов сложных антигенных комплексов бактерий с клетками-мишенями и оценка результатов такого тестирования по изменению морфофункциональных параметров клеток под действием потенциально токсических веществ «прижизненно», а не «post factum» [1, 2, 3, 5, 8, 10]. В мире накоплен большой объем информации о преимуществах этих методов как наиболее технологичных, объективных, точных и удовлетворяющих требованиям биоэтики. Для обеспечения системного подхода в оценке биологического действия изделий медицинского назначения, разрабатываемых для применения *in vivo*, в нашей стране введен в действие ГОСТ ИСО 10993.5-99 [1].

Известно, что возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, бактерия II груп-

пы патогенности для человека, вызывает у людей развитие тяжелых форм заболевания, осложненных септициемией с множественными некротическими поражениями внутренних органов, трудно поддающихся антибактериальной терапии. В ряде случаев имеют место молниеносные формы заболевания, что косвенно свидетельствует об участии в патогенезе инфекционного процесса токсических продуктов, синтезируемых бактериальной клеткой. Опубликованы данные о том, что *B. pseudomallei* продуцирует ряд биологически активных соединений, в том числе токсина, отнесенных к факторам вирулентности и патогенности возбудителя мелиоидоза [9].

Несмотря на то, что возбудитель мелиоидоза входит в список В потенциальных агентов биотерроризма, в мире до сих пор не созданы эффективные средства специфической профилактики мелиоидоза (вакцины). Исследования в этом направлении продолжаются, при этом разработка и апробация в эксперименте компонентов разрабатываемых химических вакцин предусматривает обязательный предварительный этап проверки наличия в ее составе биополимеров, повреждающих клетки тканей макроорганизма. Необходимо отметить, что исследования в части изучения цитотоксичности антигенов *B. pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур проводились ранее в ограниченном объеме.

Цель исследования: оценка потенциальной токсичности растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза на модели коллекционных линий перевиваемых клеточных культур.

Материалы и методы исследования

В опытах *in vitro* использовали две паспортизированные перевиваемые клеточные линии животного происхождения: L929 – фибробласты мыши и СНО-К1 – овариальные клетки китайского хомячка (клон линии СНО). Особенности работы с этими клетками, применяемыми нами в качестве основных индикаторных линий при изучении антигенов возбудителя мелиоидоза, а также этапность их подготовки к экспериментам, были подробно изложены нами ранее [7]. Обе линии были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Вне экспериментов коллекционные культуры клеток сохраняли в криоконсервированном состоянии в биохранилище с жидким азотом при -196°C . На всех этапах работы с индикаторными культурами использовали полусинтетическую питательную среду DMEM отечественного производства (ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ф. НуСлоп, Германия), 2 мМ глюкозамина, 4 мМ пирувата натрия, 5 мМ HEPES, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл

стрептомицина. Для снятия монослойных культур клеток с поверхности пластика использовали коммерческие растворы трипсина и версена вышеназванного производителя. Процедуру посева производили согласно данным паспорта каждой линии. Все этапы работы с перевиваемыми клеточными линиями проводили с соблюдением условий асептики [7]. Клетки выращивали в культуральных пластинах различного формата фирмы Costar при 37°C в атмосфере 5–7% CO_2 и 70% влажности.

Проверке на цитотоксичность подлежали антигены, наиболее часто применяемые в качестве иммуногенов на этапах изготовления высокоактивных поликлональных мелиоидозных сывороток, а также в случаях воспроизведения гибридомной технологии с целью получения моноклональных антител заданной специфичности на этапе антигенной стимуляции В-лимфоцитов мыши. Были приготовлены восемь образцов антигенов, полученных по методу водно-солевой экстракции смеси антигенов (ВСЭ) из обеззараженных ацетоном микробных клеток различных штаммов возбудителя мелиоидоза (шт. 57576, 56770, 51274, 59361, 100, 110, 56738, 60913) и семь образцов различных серий гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100 с м.м. 200 kDa, маркера вирулентности данного микроорганизма, изолированного с помощью модифицированного метода формамидной экстракции (ФЭ) [4]. Все применявшиеся в работе образцы антигенов возбудителя мелиоидоза были приведены к значению рН $7,0 \pm 0,1$ и подвергнуты мембранной фильтрации (0,22 мкм) во избежание контаминации растворов банальной микрофлорой.

Подготовку индикаторных культур выполняли согласно схеме, изложенной в работе, упомянутой выше. Для восстановления всех функций клеточных популяций после криоконсервированного состояния на уровне паспортных данных и их адаптации к конкретным условиям эксперимента требуется, как правило, не менее 2 недель культивирования клеточных линий. После этого составляли протокол опытов и приступали к основной части настоящего исследования.

Индикаторные культуры высевали в 24-луночные планшеты по $1,6 \cdot 10^5$ клеток в каждую лунку в объеме 0,5 мл. Через сутки после контроля формирования полноценного монослоя во всех лунках вносили испытуемые образцы антигенов в дозировке 40–50 мкл, что соответствовало по полисахаридной нагрузке 0,2–0,3 мг в каждой лунке. Для каждого антигена было взято по три лунки на пластине, остальные – контроль интактных клеток монослоя. Опыты проводили в 6-кратной повторности. Сроки наблюдения за результатами эксперимента составляли 3 суток.

Учет результатов проводили ежедневно: первоначально с помощью инвертированного микроскопа оценивали состояние клеток в монослое опытных и контрольных лунок, сравнивая их морфологические изменения и адгезивные свойства, а затем выполняли этап количественной оценки. Для этого через сутки после внесения антигена (первый день наблюдения) из первой лунки каждого опытного ряда «извлекали» весь монослой клеток. Немедленно с помощью методики прижизненной окраски клеток трипановым голубым (0,4%) и просмотра взвеси в камере Горяева определяли абсолютные и относительные показатели числа живых и погибших клеток [6]. Такую процедуру повторяли во второй и третий дни срока наблюдения. В контрольных лунках с интактными клетками ежедневно рассчитывали относительные показатели

прироста числа клеток в интактной популяции, не подверженной воздействию токсических компонентов антигенных смесей, сравнивая динамику ее роста с паспортными характеристиками соответствующей индикаторной линии.

Под острой цитотоксичностью принимали гибель клеток-мишеней более 50% по сравнению с контролем при прямом контакте с одним из вариантов антигенов возбудителя мелиоидоза. Цитопатогенный эффект проявлялся в гибели менее 50% клеток индикаторных культур по сравнению с контролем.

При обработке результатов опытов использовали компьютерную программу «Statistica 6.0», «Microsoft Office Excel 2003» с минимальной достаточной вероятностью безошибочного прогноза 95%.

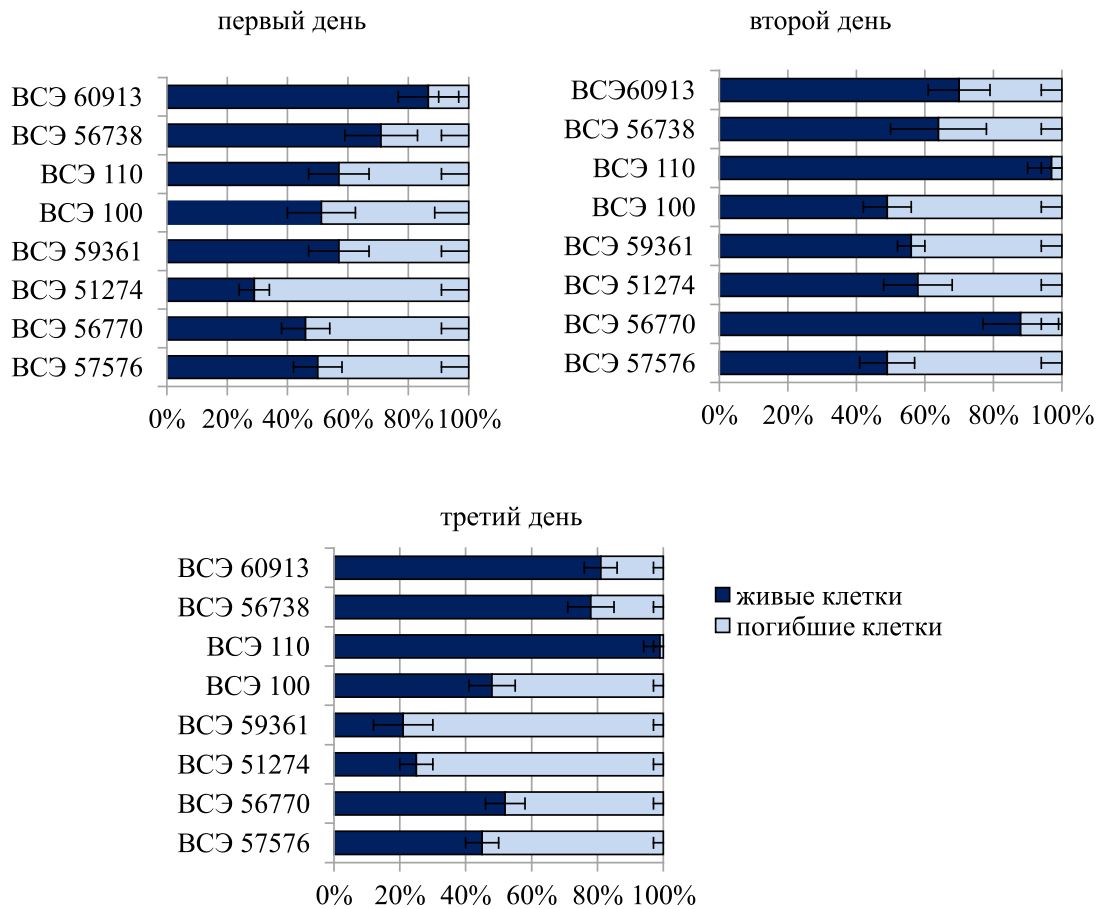
Результаты исследования и их обсуждение

Опыт работы с популяциями клеток двух коллекционных клеточных линий с известными свойствами (L929 и СНО-К1), полученный нами ранее [7], базирующийся на анализе данных о морфологических особенностях этих клеток, динамике их размножения и сроках формирования ими монослоя в лунках пластин определенного формата,

оптимальном промежутке времени культивирования посевов без смены среды и при отсутствии признаков ее истощения, позволил стандартизировать все условия постановки основных опытов по достижению цели данного исследования. При этом на всех этапах работы была отмечена высокая степень воспроизводимости результатов экспериментов.

Обе линии клеток были использованы в качестве удобных для работы, технологичных и чувствительных индикаторных культур. Установлено, что при прямом контакте растворимых антигенов (ВСЭ) *B. pseudomallei* с монослоем клеток индикаторных линий проявлялась различная степень их токсического воздействия на эти чувствительные мишени.

Достоверные отличия в гибели клеток в опытных лунках по сравнению с контролем регистрировали в течение всего срока наблюдения. При этом была отмечена зависимость морфологических изменений клеток от срока их контакта с различными образцами антигенов.



Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослое клеточной культуры СНО-К1 при контакте с ВСЭ в течение всего срока эксперимента

Изучение динамики гибели клеток линий L929 и СНО-К1 вследствие цитопатологического действия антигенных смесей свидетельствовало о том, что из десяти протестированных образцов наиболее токсичными являлись ВСЭ *B. pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361. Относительные показатели числа погибших и живых клеток в монослое клеточной культуры СНО-К1 при контакте с растворимыми антигенами возбудителя мелиоидоза представлены графически на рисунке. Результаты проверки токсичности всех использованных в работе образцов ВСЭ *B. pseudomallei* на модели клеток линии L929 не имели существенных отличий от данных, полученных при работе с индикаторной линией СНО-К1.

Наименее токсичными в отношении клеточных линий L929 и СНО-К1 обладали образцы ВСЭ *B. pseudomallei* штаммов 56770, 110, 60913, 56738. Результаты их влияния на клетки-мишени обеих линий в основном проявились в виде торможения темпов их роста и появлении зернистости в цитоплазме клеток.

Вторая серия опытов была посвящена тестированию образцов формамидных экстрактов гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100 с м.м. 200 kDa (серии 5,7, 16, 19, 22, 23, 24). Были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что в течение первых двух суток наблюдения за клетками-мишенями, находившимися в прямом контакте с предполагаемыми токсическими компонентами капсулы патогенного микроорганизма, никаких существенных изменений в их морфофункциональном состоянии не происходило. К концу третьих суток было отмечено торможение прироста клеточных популяций L929 и СНО-К1 по сравнению с контролем в опытах с образцами антигена серий 5, 16, 19, 24.

Заключение

Итогом исследований с использованием альтернативной клеточной модели проверки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* явились доказательства эффективности применения в качестве индикаторных двух монослойных клеточных культур животного происхождения: коллекционных перевиваемых линий мышинных фибробластов L929 и овариальных клеток китайского хомячка СНО-К1. Информативность применявшегося в работе теста цитотоксичности, его относительная простота в выполнении и учете результатов не вы-

зывает сомнений. К преимуществам этого альтернативного метода по сравнению с постановкой традиционной биопробы следует отнести возможности одновременного тестирования большого числа биологически активных биополимеров при их минимальном расходе и получения результатов проверки различных антигенов в течение относительно короткого промежутка времени. Последнее преимущество особенно важно для практики применения различных антигенов для стимуляции гуморального иммунитета у животных-продуцентов высокоактивных сывороток. Корректный подбор иммуногенного материала, лишённого токсичных компонентов, позволит усовершенствовать схемы получения таких сывороток.

В целом, получены достоверные данные о токсичности ряда растворимых антигенов *B. pseudomallei* на модели двух индикаторных клеточных линий L929 и СНО-К1, каждая из которых может быть объектом выбора для выполнения экспериментов по проверке цитотоксичности сложных по составу смесей антигенов и комплексных биополимеров, изолированных из микробных клеток патогенных буркхолдерий.

Список литературы

- ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*. Введ. 1999-12-29. – М.: Госстандарт, 1999. – 12 с.
- Дмитриева М.Н., Грубер И.М., Гаврилова Н.А., Титова Н.Г., Яковлева И.В., Свиридов В.В. // Журн. микробиол. – 1999. – № 2. – С. 32–35.
- Еропкин М.Ю. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов / М.Ю. Еропкин, Е.М. Еропкина. – СПб, 2003. – 240 с.
- Пивень Н.Н. Выделение, очистка и химический состав поверхностного полисахаридного антигенного комплекса возбудителя мелиоидоза / Н.Н. Пивень, В.И. Смирнова // Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биологические свойства возбудителей. Вып. 4 / Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, 1990. – С. 111–117.
- Сальникова О.И. Культура клеток в изучении и тестировании токсинов холерного вибриона: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Саратов, 1994. – 20 с.
- Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 715 с.
- Храпова Н.П., Пименова Е.В., Ломова Л.В. Способ определения цитотоксичности антигенов *Burkholderia pseudomallei in vitro* // Патент России № 2465592. 2012. Бюл. № 30.
- Animal cell culture. Third edition. A practical approach / Ed by J.W. Masters. – Oxford, 2000. – 315 p.
- Brett P.J., Woods D.E. // Acta. Tropica. – 2000. – Vol. 74. – P. 201–210.
- Walum E., Ekwall B. // ALTA. – 2000. – Vol. 28, Suppl. 1. – P. 159.