

ЭФФЕКТИВНАЯ КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

^{1,2}Пименова Е.В., ^{1,2}Храпова Н.П.

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
Волгоград, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru;

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: post@volgmed.ru

Статья посвящена рассмотрению подбора эффективной клеточной модели для оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза. В работе были использованы перевиваемые клеточные линии: CHO-K1 – овариальные клетки китайского хомячка, L929 – мышинные фибробласты и HeLa S3 – клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека. В качестве цитотоксического агента были выбраны восемь образцов водно-солевых экстрактов (ВСЭ) из обеззараженных ацетоном клеток возбудителя микроорганизма II группы патогенности возбудителя мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*, штаммы 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738). В рамках исследования по оценке цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* установлено, что наиболее выраженной токсичностью обладали образцы антигенов *B. pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361 в отношении клеточных линий CHO-K1 и L929. Использование клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa S3 возможно только в ограниченном объеме в первые дни эксперимента, так как при работе с ними затруднена стандартизация условий проведения опытов и их воспроизводимость. Наиболее эффективной клеточной моделью являются монослойные клеточные линии мышинных фибробластов L929 и овариальные клетки китайского хомячка CHO-K1.

Ключевые слова: культура клеток, перевиваемые клеточные линии, *Burkholderia pseudomallei*, цитотоксичность, тест *in vitro*

EFFECTIVE CELL MODEL FOR CYTOTOXICITY EVALUATION OF MELIOIDOSIS ANTIGENS

^{1,2}Pimenova E.V., ^{1,2}Khrapova N.P.

¹Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru;

²Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: post@volgmed.ru

The article aims to consider an effective cell model to assess the cytotoxicity of melioidosis antigens. The following continuous cell lines were used in the study: CHO-K1-chinese hamster ovarian cells, L929 – mouse fibroblasts, and HeLa S3-human cervical epithelioid carcinoma cells. For the comparative analysis of human and animal continuous cell lines, eight samples of water-salt extracts (WSE) from acetone-disinfected cells of microorganism II group of pathogenicity – causative agent of melioidosis, *B. pseudomallei*, strains 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738 were used in the microcytotoxicity test. As part of the study to assess the cytotoxicity of melioidosis antigens *in vitro*, it was found that the most effective model is the monolayer cell lines of mouse fibroblasts L929 and ovarian cells of the chinese hamster CHO-K1. The use of cells of the epithelioid carcinoma of the cervix of the human HeLa S3 as targets is possible only in a limited volume in the first three days of the experiment, since the standardization of the experimental conditions and their reproducibility is difficult when working with them.

Keywords: cell culture, continuous cell lines, *Burkholderia pseudomallei*, cytotoxicity, *in vitro* test

Всемирная Организация Здравоохранения и международное медико-биологическое общество рекомендует использовать альтернативные методы и модели, такие как, например, применение перевиваемых клеточных культур, взамен общепринятых тестов на лабораторных животных [1]. Это связано прежде всего с вопросами этического, экономического и разумного использования лабораторных животных в исследовательских целях, а также потому, что эксперименты с использованием животных трудоемки, длительны и не всегда воспроизводимы. При изучении оценки потенциально токсичных биополимеров важную

роль отводят коллекционным клеткам-мишеням. С 1999 г. в нашей стране действует Государственный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 10993.5-99, один из разделов которого (часть 5 «Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*») посвящен чрезвычайно важным вопросам, в частности апробации в эксперименте компонентов потенциальных химических вакцин, обязательно проверяемых на наличие в их составе биополимеров, повреждающих клетки тканей макроорганизма [2–4].

Использование стандартных клеточных линий с известными свойствами обеспечивает возможность их применения для

качественной и количественной оценки в относительно короткий промежуток времени, а также возможность прижизненного наблюдения и оценки результатов взаимодействия компонентов сложных комплексов с клетками-мишенями по изменению морфофункциональных параметров клеток под действием потенциально токсических биополимеров. В связи с вышеизложенным, коллектив авторов посчитал целесообразным определить воспроизводимую и чувствительную клеточную модель для изучения патогенности возбудителя мелиоидоза взамен общепринятых тестов на лабораторных животных [5, 6].

Цель исследования: установить эффективную клеточную модель для оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза.

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели были использованы перевиваемые клеточные линии животного и человеческого происхождения, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных института цитологии РАН (г. С.-Петербург): СНО-К1 – овариальные клетки китайского хомячка, клон линии СНО, L929 – клетки подкожной соединительной ткани мыши СЗН/An, HeLa S3 – клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека, сублинии HeLa.

Культуры клеток постоянно сохраняли в криоконсервированном состоянии в биохранилище с жидким азотом при -196°C . После вывода клеточной линии из криоконсервированного состояния жизнеспособность клеток составила не менее 96%.

Клеточные линии культивировали в полусинтетической питательной среде DMEM (ГУП по производству бактериальных и вирусных препаратов института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Россия). Для тиражирования популяции клеток готовили полную среду: основная среда DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ф. NuClone, Германия), 2 mM L-глутамин, 4 mM пирувата натрия, комплекса аминокислот, NEPER 5 mM, с pH 7,1–7,2 среды. Для снятия клеточных линий с поверхности пластика применяли стандартные растворы 0,25%-ный р-р трипсина и 0,02%-ный р-р версена (вышеназванного производителя) в соотношении 1:2. Пересев монослойных клеточных линий СНО-К1, L929 осуществляли 2 раза в неделю. Во избежание контаминации все процедуры проводили в стерильных условиях.

Культивирование популяции осуществляли в пластиковой посуде фирмы Costar (Multiple well plates) в CO_2 -инкубаторе при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, в атмосфере 5–7% CO_2 и 70% влажности. В 24-л пластины с площадью лунок $1,9 \text{ см}^2$ высевали перевиваемые клеточные линии животного происхождения (СНО-К1, L929) в концентрации $1,6 \times 10^5$ клеток в каждую лунку в объеме 0,5 мл среды. Посевная концентрация была выбрана с целью формирования сплошного монослоя, во избежание ошибочной интерпретации результатов при воздействия токсического эффекта биополимеров на клетки-мишени. Для культуры клеток HeLa S3 использовали 48-луночные

пластины, концентрация клеток в каждую лунку составила $0,5 \cdot 10^5$ клеток в объеме 0,25 мл среды.

Для сравнительной характеристики перевиваемых клеточных линий различного происхождения в тесте микроцитотоксичности были использованы восемь образцов водорастворимых антигенов, приготовленных из ультразвуковых дезинтегратов различных штаммов возбудителя мелиоидоза из обеззараженных ацетоном клеток возбудителя микроорганизма II группы патогенности возбудителя мелиоидоза (*B. pseudomallei*, штаммы 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738). Антигенные препараты отличаются друг от друга по углеводному и белковому составу, а также по LD50 для лабораторных животных.

В опытные лунки с культурами клеток L929, СНО-К1 и HeLa S3 через сутки, добавляли образцы ВСЭ *B. pseudomallei* штаммы 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738 в дозировке 40 мкл в каждую лунку, что соответствовало по полисахаридной нагрузке 0,3 мг (день внесения антигенов в лунки считали 0). В качестве контроля на каждой пластине присутствовали лунки с интактной культурой. Срок наблюдения составлял трое суток. В течение всего срока эксперимента ежедневно производили качественную и количественную оценку результатов, оценивая морфологию и функциональное состояние индикаторных культур. Количественную оценку и жизнеспособность клеток-мишеней оценивали с помощью теста прижизненной окраски трипановым синим (0,4%). В соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993.5–99 все серии экспериментов проводили с шестью повторами для каждой серии опыта [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Период адаптации индикаторных культур к подобранным условиям культивирования после выведения из криоконсервированного состояния составил две недели. Клетки-мишени восстанавливали пролиферативную активность на уровне паспортных данных, что позволило проводить масштабирование популяций в объемах, необходимых для выполнения дальнейших экспериментов. Установлено, что монослой клеточных линий формировался через сутки после высева клеток в пластину для культивирования.

Скрининг ВСЭ антигенов возбудителя мелиоидоза показал, что образцы ВСЭ *B. pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361 оказали максимально выраженный цитотоксический эффект при контакте с индикаторными культурами СНО-К1 и L929, в то время как ВСЭ *B. pseudomallei* штаммов 56770, 110, 56738, 60913 проявили различную степень цитотоксичности и цитопатогенности в отношении монослойных клеточных линий. Выраженной токсичностью обладали образцы антигенов *B. pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361 в отношении клеточных линий СНО-К1 и L929, ниже приведены графи-

ческие изображения относительных показателей числа жизнеспособных клеток в монослое клеточных культур при контакте с антигеном *B. pseudomallei* 57576 в течение всего срока эксперимента (рис. 1, 2). Через сутки у клеток отмечали изменения цитоплазмы в виде вакуолизации, зернистости, изменения ядра в форме лизиса, изменения формы клетки в виде набухания, округления, утончения или полного разрушения клетки, выявляемые при $100\times$ увеличении.

Множественный скрининг антигенов возбудителя мелиоидоза в тесте микроцитотоксичности на перевиваемой клеточной линии HeLa S3 показал, что водораствори-

мые антигены *B. pseudomallei* 100, 57576, 51274, 59361 обладали пролонгированным цитопатогенным эффектом, результаты регистрировали через трое суток контакта клеток-мишеней с этими антигенами. В качестве примера ниже приведены относительные показатели числа жизнеспособных клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa S3 с антигеном *B. pseudomallei* 57576 в течение всего срока эксперимента (рис. 3). В то же время каких-либо изменений в индикаторной культуре в присутствии водорастворимых антигенов *B. pseudomallei* 56770, 110, 60913, 56738 не было выявлено.

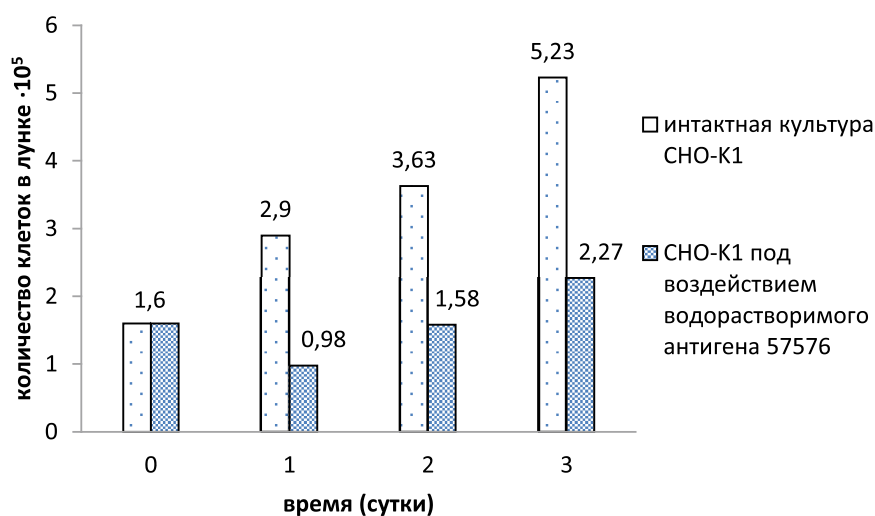


Рис. 1. Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослое клеточной культуры CHO-K1 при контакте с водорастворимым антигеном *B. pseudomallei* 57576 в течение всего срока эксперимента

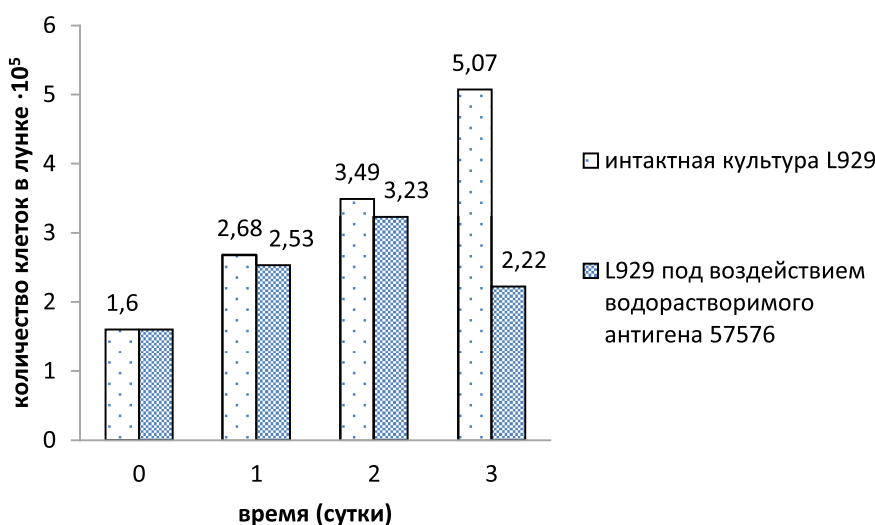


Рис. 2. Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослое клеточной культуры L929 при контакте с водорастворимым антигеном *B. pseudomallei* 57576 в течение всего срока эксперимента

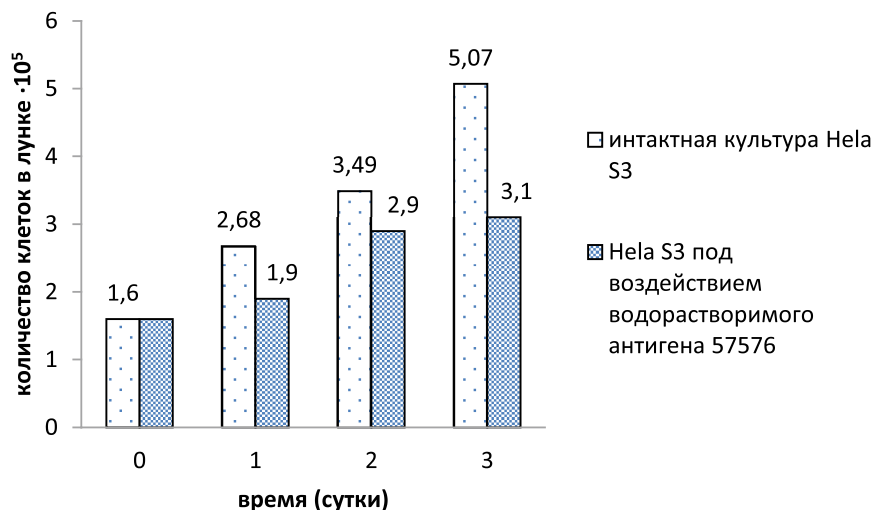


Рис. 3. Относительные показатели числа жизнеспособных клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa S3 с водорастворимым антигеном *B. pseudomallei* 57576 в течение всего срока эксперимента

Заключение

Таким образом, установлено, что чувствительность трех апробированных клеточных линий в отношении восьми вариантов антигенов *B. pseudomallei* колебалась в диапазоне от резко выраженного токсического воздействия до минимальных цитопатогенных изменений, проявляющихся в виде морфологических изменений на клетках-мишенях.

Использование клеточной линии эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa S3 в качестве индикаторной культуры в тесте микроцитотоксичности возможно при изучении цитотоксических и цитопатогенных свойств возбудителя мелиоидоза в первые сутки эксперимента, это связано прежде всего с высокими темпами пролиферации клеток культуры сублинии HeLa.

Сравнительное исследование эффектов цитотоксичности и цитопатогенности в отношении индикаторных линий свидетельствовало о том, что клетки линии СНО-К1 обладали относительно высокой чувствительностью в отношении антигенов возбудителя мелиоидоза, что делает ее эф-

фективной клеточной моделью для оценки цитотоксичности антигенных комплексов возбудителя мелиоидоза.

Список литературы

1. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М., 2010. 344 с.
2. ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. М.: Госстандарт, 1999. 12 с.
3. Дмитруха Н.Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях // Medix Anti-Aging. 2013. № 3 (33). С. 50–55.
4. Романова М.А., Додонова А.Ш. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток // Молодой ученый. 2016. № 18. С. 110–114.
5. Храпова Н.П., Корсакова И.И., Ломова Л.В., Напалкова Г.М., Давыдова Н.В., Чупрына Н.А., Ободова М.А., Дрефс Н.М. Способ определения предельно допустимой антигенной нагрузки, стимулирующей продукцию гуморальных антител // Патент РФ № 2371196. Патентообладатель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. 2008.
6. Сенина Т.В., Илюхин В.И., Шубникова Е.В. Способ подбора высокоактивного антибактериального средства для лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдерами // Патент РФ № 2404252. Патентообладатель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. 2009.