

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO*

Н. П. Храпова, Е. В. Пименова, Л. В. Ломова

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,
Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра молекулярной биологии и генетики*

В работе обобщены результаты применения перевиваемых монослойных клеточных линий мышиных фибробластов L929 и клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 для оценки биологической активности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro*. На модели индикаторных клеток получены объективные данные о степени токсичности ряда антигенов *Burkholderia pseudomallei*.

Ключевые слова: возбудитель мелиоидоза, антигены, экспериментальная модель *in vitro*, клетки-мишени, цитотоксичность.

EVALUATION OF TOXICITY TESTING OF DIFFERENT ANTIGENS OF BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ON CELL LINES *IN VITRO*

N. P. Khrapova, E. V. Pimenova, L. V. Lomova

This study investigated cytotoxicity of antigens of *Burkholderia pseudomallei*. The cytotoxicity assay was performed *in vitro* using cell cultures (L929 mouse fibroblast cell line and CHO-K1 chinese hamster ovarian cell line). Application of these monolayer cultures made it possible to obtain objective data about biological activity and cytotoxicity of some antigens of *Burkholderia pseudomallei*.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, antigens, experimental model *in vitro*, target cell, cytotoxicity.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выбор клеточной модели для определения токсических свойств антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* и разработка оптимизированных условий постановки тестов цитотоксичности, предназначенных для выявления *in vitro* токсичных компонентов в биологически активных комплексах, изолированных из микробных клеток возбудителя мелиоидоза.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на модели двух монослойных клеточных линий: L929 (мышинные фибробласты) и CHO-K1 (клетки яичника китайского хомячка), полученных из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П) института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Вне периода постановки опытов коллекционные культуры клеток сохраняли в криоконсервированном состоянии в биохранилище с жидким азотом при -196°C .

Все этапы работы с перевиваемыми линиями клеток были выполнены в соответствии с рекомендациями [4, 7].

Для культивирования клеток использовали пластиковую посуду различного формата для работы с клеточными культурами (Multiple well plates, ф. Costar) и отечественную полусинтетическую питательную среду F12 производства ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов» института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН. На ее основе готовили полную среду выращивания, используемую на всех этапах работы с клеточными культурами [4]. Для снятия монослоя кле-

ток с поверхности пластика применяли коммерческие растворы трипсина и версена. Культивирование проводили в CO_2 -инкубаторе при 37°C , концентрации CO_2 5—7 %, влажности не менее 70 %.

Каждый цикл исследований по проверке цитотоксичности испытуемых образцов антигенов состоял из ряда последовательных этапов: размораживание клеток L929 и CHO-K1, их адаптация к условиям культивирования, контроль жизнеспособности клеток, морфологии и адгезивных свойств, пролиферативной активности. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест окраски трипановым голубым [1].

В течение первых двух недель в периоде адаптации индикаторных культур к условиям культивирования ежедневно просматривали высевы с помощью инвертированного микроскопа. Смену среды и пересевы клеток выполняли каждые 3—4 суток, постепенно наращивая популяцию каждой из линий до концентраций, необходимых для выполнения основных опытов. На этапе подготовки были определены оптимальные концентрации кл/см² поверхности лунки, обеспечивающие формирование в течение суток монослоя клеток-мишеней, равномерно заполняющего всю площадь лунки.

При выполнении микроварианта теста цитотоксичности, применявшегося для множественного скрининга различных антигенов возбудителя мелиоидоза, использовали 48-луночные (48-л) пластины, в лунки которых вносили по 6×10^4 клеток в объеме 0,25 мл. Для изучения динамики гибели клеток-мишеней вследствие контакта с антигеном был изменен формат плас-

тин. В каждую лунку 12-луночных (12-л) пластин вносили по 3×10^5 клеток в объеме 1 мл. Через сутки пластины со сформированным монослоем клеток-мишеней были готовы к постановке основных опытов. Как в первом, так и во втором варианте исследования выполняли одновременно на двух линиях клеток.

Объектами тестирования являлись антигены *Burkholderia pseudomallei* (10 образцов), отличавшиеся по химическому составу и локализации в микробной клетке, изолированные из капсульной субстанции, клеточной стенки или являвшиеся смесью водорастворимых компонентов бактерий, прошедшие контроль специфической стерильности. Объемы вносимых образцов варьировали в зависимости от формата опытных пластин (от 1—2 до 40 мкл). На каждой пластине в 2—3 лунки с монослоем антиген не вносили (контроль). Время контакта клеток с антигеном — 3 суток, условия инкубации, как описано выше, просмотр и регистрация результатов — ежедневно. Учету подлежали время контакта биологически активного вещества с клетками, концентрации вносимых веществ в лунку, морфологические изменения и адгезивные свойства клеток. При учете результатов использовали качественные и количественные показатели (в зависимости от целевой установки конкретного опыта).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность работы с паспортизированными клеточными линиями с хорошо изученными свойствами (морфология клеток, характер роста, питательные потребности) в значительной степени облегчила выполнение подготовительных этапов по адаптации культур L929 и CHO-K1 к конкретным условиям и последующей оптимизации режимов наращивания популяций в культуральных пластинах различного формата. При этом была изучена не только типичная морфология клеток, но и проведена оценка репродуктивного потенциала популяций.

Анализ характера кривых роста популяций свидетельствовал об активной пролиферации клеток в оптимизированных условиях их культивирования, а также позволил определить временной интервал, при котором среда культивирования не истощается и возможен корректный учет результатов воздействия антигенов на клетки-мишени, равный 4 суткам (рис.).

При постановке микроварианта теста цитотоксичности в лунки опытных 48-л пластин вносили образцы антигенов в объеме 20 мкл. В течение 3 суток наблюдения было отмечено нарастание изменений в популяциях клеток. В случаях токсического воздействия антигенов на монослой клеток индикаторных культур изменялась их форма, появлялись удлинённые, округлые, увеличенные в объеме, полигональные клетки, внутриклеточные включения, разрушенные клетки и их тени, детрит в межклеточных пространствах, участки свободной поверхности пластика, площадь которых при нарастании числа погибших клеток увеличивалась.

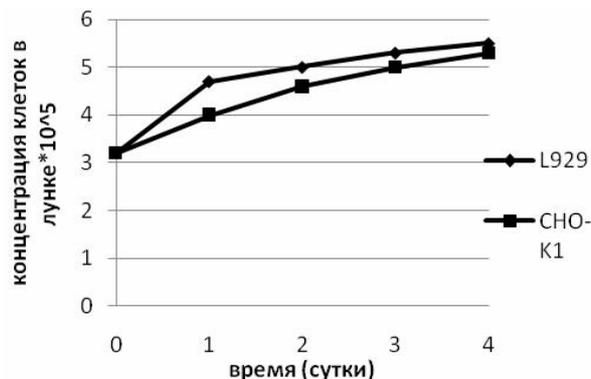


Рис. Кривые роста популяций клеток L929 и CHO-K1 в течение срока наблюдения

В результате первичного тестирования образцов антигенов установлено, что наиболее выраженным токсическим воздействием на клетки-мишени обладали экзополисахариды внеклеточной капсульной субстанции *B. pseudomallei* 100 и 57576, вызвавшие массовую гибель клеток L929 и CHO-K1 уже в течение первых суток. В то же время какие-либо изменения в монослойных культурах линий L929 и CHO-K1 в присутствии двух антигенов, липида А и кор-антигена *B. pseudomallei* 100 не отмечены. Различную степень цитопатогенности проявили остальные из проверенных антигенов (гликопротеин капсулы *B. pseudomallei* 100, кор-Ag *B. pseudomallei* 57576, комплекс Ag 6+d *B. pseudomallei* 57576, водно-солевые экстракты *B. pseudomallei* 51274, 60913 и 100).

Микровариант теста цитотоксичности был использован для определения минимальных токсических доз (МТД) антигенов, использованных в работе. Этот показатель МТД является характеристикой конкретного образца препарата и был необходим для корректной оценки результатов экспериментов по изучению динамики гибели клеток-мишеней при контакте с антигенами *B. pseudomallei*, выполненных в формате 12-л пластин, с подсчетом относительных показателей жизнеспособности клеток при воздействии на них различных доз антигенов.

В опытах по изучению динамики гибели клеток-мишеней при контакте с антигенами *B. pseudomallei*, применявшихся в различных дозировках, были получены следующие данные (рис. 2). Установлено, что через сутки после внесения 3 МТД экзополисахарида *B. pseudomallei* 100 в лунки со сформированным монослоем клеток наступала массовая гибель в популяциях клеток как L929, так и CHO-K1. Этот факт свидетельствовал о том, что данные линии клеток пригодны для использования в качестве индикаторных культур при выявлении случаев острой токсичности в течение относительно короткого периода времени (1 сут), особенно когда это касается биополимеров, входящих в группу факторов вирулентности *B. pseudomallei*.

Антигены внеклеточной субстанции *B. pseudomallei* были представлены еще одним антигеном — гликопротеином 200 kDa *B. pseudomallei* 100. В субтоксической дозировке 0,5 МТД он не вызывал патологических изменений клеток-мишеней. Эти данные будут востребо-

ваны нами для коррекции схем иммунизации животных-продуцентов специфических сывороток к антигену-маркеру вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза.

Выраженное цитопатогенное воздействие на клетки-мишени оказал кор-антиген *B. pseudomallei* 57576, который в дозировке 0,8 МТД вызывал к концу срока наблюдения гибель 20 и 25 % клеток в популяциях линий L929 и СНО-К1 соответственно. При этом отличия в снижении жизнеспособности клеток линий L929 и СНО-К1 по сравнению с началом опыта как в первом, так и во втором случае были достоверными ($p < 0,05$). При этом следует отметить, что во всех апробированных вариантах тестов существенных отличий в чувствительности клеток L929 и СНО-К1 в отношении одних и тех же антигенов не выявлено.

Разнообразие вариантов влияния на жизнеспособность клеток-мишеней подтвердили опыты с использованием 3 образцов водно-солевых экстрактов различных штаммов *B. pseudomallei*, два из которых оказывали слабо выраженное цитопатогенное воздействие на клетки. Третий — водно-солевой экстракт *B. pseudomallei* 51274. Этот антиген достоверно снижал показатели числа жизнеспособных клеток в популяциях L929 и СНО-К1 на 19 и 30 % соответственно (в случае применения дозировки, равной 0,7 МТД).

Таким образом, выполненное исследование позволило получить новые данные о характере биологической активности использованных в работе соединений непосредственно на клеточном уровне. Апробирована клеточная модель для определения токсических свойств антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro*. Разработаны приоритетные варианты тестов цитотоксичности *in vitro*, которые могут найти применение в качестве дополнительного метода оценки: 1) потенциальных компонентов экспериментальных химических комплексов вакцин; 2) корректного выбора антигенного материала для воспроизведения различных схем иммунизации животных-продуцентов гипериммунных сывороток; 3) динамики накопления токсичных метаболитов в жидких питательных средах выращивания штаммов *B. pseudomallei* с различной вирулентностью для био-моделей; 4) при отборе штаммов-продуцентов токсичных биополимеров *B. pseudomallei*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Области практического применения культур переносимых линий клеток для тестирования *in vitro* различных биополимеров постепенно расширяются [3, 9, 10].

В настоящее время преимущества определения цитотоксичности антигенов *in vitro* по сравнению с постановкой биопробы в части экономичности, универсальности, воспроизводимости, относительной простоты в исполнении не вызывает сомнения [2, 5, 8]. Однако сведения о применении клеточных моделей *in vitro* для изучения и оценки токсичности различных антигенных комплексов *B. pseudomallei* ограничены. Известно, что возбудитель мелиоидоза продуцирует ряд биологически активных соединений, в том числе токсинов, частично охарактеризованных, выявляемых чаще всего в жидких средах культивирования, входящих в группу соединений, отнесенных к факторам вирулентности и патогенности *B. pseudomallei* [6]. Изучение этих факторов во взаимодействии с клеткой в тестах *in vitro* — востребованное и актуальное направление исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вилсон Э. // Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни. — М.: Мир, 1989. — С. 256—303.
2. Дмитриева М. Н., Грубер И. М., Гаврилова Н. А. и др. // Журн. микробиол. — 1999, № 2. — С. 32—35.
3. Еролкин М. Ю. // Токсикол. вестн. — 1999. — № 5. — С. 7—13.
4. Культура животных клеток. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Р. Фрешни. — М.: Мир, 1989. — 333 с.
5. Лукьянов А. С., Лукьянова Л. Л., Чернавская Н. М., Гилязов С. Ф. // Биэтика. — М.: Изд-во МГУ, 1996. — 253 с.
6. Пивень Н. Н., Илюхин В. И. // Журн. микробиол. — 2000. — № 6. — С. 94—99.
7. Animal cell culture. Third edition. A practical approach / Ed by J. W. Masters. — Oxford, 2000. — 315 pp.
8. Grant R. L., Acosta J. D., Smith M. A. // Comprehensive Toxicology on CD-ROM. — Elsevier Sci., 1997. — Vol. 1.
9. Wilson A. P. Cytotoxicity and viability assays. Ch. 7 // In Animal cell culture. Third edition. A practical approach. — Oxford, 2000. — P. 175—219.
10. Walum E., Ekwall B. // ALTA. — 2000. — Vol. 28, Suppl. 1. — P. 159.

Контактная информация

Храпова Наталья Петровна — д. м. н., профессор кафедры молекулярной биологии и генетики, Волгоградский государственный медицинский университет, зав. отделом иммунологии и лабораторией иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, e-mail: khrapovanp@gmail.com