

*На правах рукописи*

**ПИМЕНОВА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ АНТИГЕНОВ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА *IN VITRO* НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ  
КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой  
степени кандидата медицинских наук

Волгоград – 2016

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

***Научный руководитель:***

**Храпова Наталья Петровна** – доктор медицинских наук, профессор

***Официальные оппоненты:***

**Девдариани Зураб Леванович** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник организационно-методического отдела с научной частью ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов.

**Тюменцева Ирина Степановна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь.

***Ведущая организация:*** ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону.

Защита диссертации состоится «...» мая 2016 г. в ... часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.06 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1. E-mail: [post@volgmed.ru](mailto:post@volgmed.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1. E-mail: [post@volgmed.ru](mailto:post@volgmed.ru).

Автореферат разослан «...» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор социологических наук,

кандидат медицинских наук,

профессор

**Ковалева Марина Дмитриевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Традиционные методы определения потенциально токсичных веществ на модели лабораторных животных трудоемки, длительны, требуют существенных затрат и характеризуются нестабильной воспроизводимостью, обусловленной индивидуальными реакциями животных на введение тестируемого материала (Еропкин М.Ю., 1999; Wikraiphat С., 2009). Поиск альтернативного метода взамен общепринятой методики *in vivo* был направлен на минимизацию числа лабораторных животных, применяемых в исследованиях, удешевление процедуры тестирования потенциально токсичного вещества и стандартизацию всех этапов этого процесса (Masters J.R., 2000). Альтернативой явились методы оценки токсичности различных соединений *in vitro* с применением самых разнообразных моделей, в числе которых беспозвоночные животные, растения, гидробионты, микроорганизмы и культуры клеток (Завьялов Н.В. с соавт., 1998; Каркищенко Н.Н., 2006; Жукова С.И. с соавт., 2006; Данченко Е.О., 2012; Ekwall, В., 1980, 1999).

К настоящему времени в мире накоплен большой объем информации о преимуществах этих методов как наиболее технологичных, объективных, точных и удовлетворяющих требования биоэтики. Большое внимание вопросам разработки и внедрения в практику альтернативных методов уделяют международные организации: International Organization for Standardization (ISO) и The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (Дмитруха Н.Н., 2013; Gillis, M., 2012).

В нашей стране с 1999 года действует Государственный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 10993.5-99, один из разделов которого (часть 5 «Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*») посвящен апробации в эксперименте компонентов потенциальных химических вакцин, обязательно проверяемых на наличие в их составе биополимеров, повреждающих клетки тканей макроорганизма.

Методики с использованием перевиваемых клеточных линий для изучения цитотоксичности в последние годы получили широкое распространение во многих областях медицинской деятельности, в том числе и в прикладной микробиологии. Применение коллекционных паспортизированных линий клеток с известными свойствами обеспечивает воспроизводимость результатов опытов по изучению характера биологической активности тестируемых соединений непосредственно на клеточном уровне, позволяет оценивать состояние клеток-мишеней прижизненно, а не «post factum». К достоинствам этих методов относятся также возможность одновременного тестирования большого числа биологически активных биополимеров при их минимальном расходе и получение результатов проверки в течение относительно короткого промежутка времени (Вечканов Е.М., Сорокина И.А., 2012).

Адекватность замены традиционной биопробы более технологичной клеточной моделью в условиях *in vitro* в случаях оценки биологической активности ряда бактериальных токсинов подтверждена экспериментально (Сальникова О.И., 1994; Буркин М.А., 1997; Дмитриева М.Н., с соавт., 1999, Маркина, О.В., 2008; Ободова М.А. 2007; Ekwall, B., 1980, 1999; Wilson A.P. et al., 2000; Фрешни Р., 2011). Отмечено, что этот метод по чувствительности сопоставим с разрешающей способностью биопробы, прежде всего, когда речь идет о работе с экзотоксинами (Дмитриева М.Н., с соавт., 1999; Ободова М.А. 2007).

Несмотря на интенсивное развитие направления по оценке токсичности различных биологически активных соединений на модели перевиваемых клеточных культур, изучение токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза проводили ранее в ограниченном объеме (Жукова С.И. с соавт., 2006).

Известно, что возбудитель мелиоидоза продуцирует ряд биологически активных соединений, в том числе токсинов, частично охарактеризованных, входящих в группу соединений, отнесенных к факторам вирулентности и патогенности *B.pseudomallei* (Пивень с соавт., 2001, 2005; Ismail G.A. et al., 1987; Häußler S. et al., 1998; Brett P.J. et al., 2000; Galyov E.E. et al., 2010).

Регистрируемые в регионах эндемичного распространения *B.pseudomallei* тяжелые формы мелиоидоза, осложненные септицемией с множественными некротическими поражениями внутренних органов, трудно поддающиеся антибактериальной терапии, а также молниеносные формы этой инфекции, косвенно свидетельствуют об участии в патогенезе заболевания токсичных продуктов, синтезируемых данным патогеном (Haase A. et al., 1997). Скоротечные формы мелиоидозной инфекции чаще всего расценивают как следствие воздействия на макроорганизм целого комплекса токсичных антигенов, секретируемых бактериями (экзотоксин, экзополисахарид) и ассоциированных с микробной клеткой (ЛПС, липид А). Изучение этих факторов во взаимодействии с клеткой в тестах *in vitro* – актуальное направление исследований. Поиск эффективной клеточной модели *in vitro* для оценки цитотоксичности индивидуальных образцов мелиоидозных антигенов, причисляемых к наиболее перспективным компонентам экспериментальных вакцин, будет способствовать получению новых данных об их свойствах.

**Цель работы** – разработка оптимизированных условий постановки теста микроцитотоксичности, предназначенного для выявления *in vitro* токсичных компонентов в биологически активных комплексах, изолированных из микробных клеток возбудителя мелиоидоза, и изучение возможности нейтрализации токсических свойств антигенов *B. pseudomallei*, вызывающих гибель клеток-мишеней, с помощью специфических МКА различной эпитопной направленности.

### **Задачи исследования**

1. Изучить морфофункциональные свойства ряда коллекционных перевиваемых клеточных линий (L929, CHO-K1, HeLa S3 и HeLa ТК), определить сроки адаптации популяций индикаторных культур к конкретным условиям культивирования и сроки формирования монослоя клеток в лунках культуральных пластин различного формата.

2. Определить параметры постановки теста микроцитотоксичности и критерии оценки получаемых результатов.

3. Провести скрининговое тестирование антигенов *B. pseudomallei* и оценить их токсичность на модели перевиваемых клеточных линий.

4. Изучить эффективность применения мелиоидозных МКА различной эпитопной направленности в качестве цитопротекторов для защиты индикаторных клеток от токсического воздействия антигенов возбудителя мелиоидоза.

### **Научная новизна**

Получены приоритетные данные, свидетельствующие об эффективности применения перевиваемых клеточных линий животных и человека в качестве альтернативной модели для изучения цитотоксического и цитопатогенного воздействия растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза на эти мишени.

Установлена наиболее адекватная клеточная модель (L929 и CHO-K1) для изучения *in vitro* цитотоксичности и цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза и определены критерии оценки их воздействия на индикаторные культуры.

Впервые на модели монослойных перевиваемых клеточных линий L929 и CHO-K1 изучены протективные свойства мелиоидозных МКА против различных эпитопов антигенов, экспонированных на поверхности микробных клеток возбудителя мелиоидоза. Представлены доказательства достоверного увеличения числа живых клеток в популяциях вследствие применения МКА в качестве цитопротекторов.

Впервые в качестве индикаторных культур для выявления токсичных свойств антигенов *B. pseudomallei* в тесте микроцитотоксичности были апробированы клетки двух сублиний человеческой эпителиодной карциномы шейки матки HeLa S3 и HeLa ТК.

Обоснована значимость альтернативного метода определения токсичности с использованием перевиваемых клеточных линий для оценки цитотоксичности и цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза и возможность его применения в качестве метода скрининга на этапе предварительной проверки большого числа образцов антигенов различного целевого назначения.

Новизна «Способа определения цитотоксичности антигенов *Burkholderia pseudomallei in vitro*» подтверждена патентом на изобретение № 2465592 от 27.10.2012.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработана методика постановки микроварианта теста определения цитотоксичности и цитопатогенности сложных по составу компонентов смесей антигенов возбудителя мелиоидоза, используемых при иммунизации животных с целью получения гипериммунных сывороток или в качестве компонентов экспериментальных вакцинных препаратов.

Оптимизированы условия постановки ряда вариантов теста микроцитотоксичности, предназначенных для оценки биологической активности антигенов *B. pseudomallei in vitro*. Конкретизирована этапность и условия подготовки клеточных культур для последующего применения в тестах по определению цитотоксичности *in vitro*, определены критерии оценки результатов опытов, сроки регистрации морфологических изменений клеток-мишеней в ответ на воздействие токсичных субстанций.

Даны рекомендации по применению использованных в работе перевиваемых линий клеток в качестве индикаторных культур, обеспечивающих выявление токсичности испытуемых образцов антигенов.

Представлены доказательства эффективности применения альтернативной модели не только для оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro*, но и для отбора цитопротекторов, в качестве которых апробированы мелиоидозные моноклональные антитела. Оба варианта постановки теста микроцитотоксичности пригодны для использования на этапах лабораторного анализа различных внеклеточных или ассоциированных с клеточными структурами биополимеров.

Результаты исследований, обобщенных в работе, были использованы при оформлении «Методических рекомендаций по применению клеточной модели для оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro*» (Рассмотрены ученым советом 23.06. 2011, протокол № 6. Утверждены директором института 23.06.2011).

Практическая значимость работы состоит также в пополнении существующей коллекции гибридом-продуцентов МКА двумя новыми вариантами гибридных клеток. Обе, вновь полученные гибридомы, были депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под номерами Н-30 Н-40 и Н-41 соответственно: 1) штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* Bpm Vd-8 – продуцент моноклонального антитела 3С6/А9 к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза 2) штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. Bpm Vd-11 – продуцент моноклонального антитела 6А11/Г12 к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза.

## **Методология и методы исследования**

В работе были использованы следующие методы исследования: микробиологические (культивирование штаммов микроорганизмов), культуральные (культивирования перевиваемых клеточных линий и гибридом-продуцентов моноклональных иммуноглобулинов), иммунохимические, биохимические, микроскопические и статистические методы обработки результатов.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Перевиваемые клеточные линии являются перспективной моделью для использования их в качестве индикаторных культур при изучении цитотоксических свойств антигенов возбудителя мелиоидоза.
2. Разработанная методика микроварианта теста *in vitro* пригодна для проведения множественного скрининга антигенов возбудителя мелиоидоза.
3. Основными критериями оценки цитотоксичности и цитопатогенности тестируемых антигенных комплексов являются морфологические изменения клеток-мишеней, нарушение функции распластывания на поверхности пластика, а также абсолютные и относительные показатели числа жизнеспособных клеток в опытных лунках по сравнению с контролем. Гибель 50 % клеток и более при контакте с антигеном – проявление его токсичности.
4. Монослойные перевиваемые клеточные линии животного происхождения – эффективная модель для оценки нейтрализации токсичного воздействия антигенов *Burkholderia pseudomallei* с помощью моноклональных антител (МКА) различной эпитопной направленности.

**Личный вклад соискателя.** Основные экспериментальные данные, обобщенные в диссертационной работе, получены лично автором. Выбор направления исследований, постановка научной цели и задач, обоснование полученных результатов были выполнены при участии руководителя диссертации.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Обоснованность и достоверность результатов проведенных исследований обусловлена объемом экспериментального материала, значимостью выборки анализируемого материала, использованием современных методов исследования, статистической обработкой полученных данных.

Материалы диссертации представлены на X Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ (Ставрополь, 2010), III научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов НИО Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболensk, 2011), доложены на 69-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград,

2011), конференции молодых ученых ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Волгоград, 2012), II всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), XX Юбилейном конгрессе «Человек и лекарства» (Москва, 2013), V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2013г), VI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2014), научной-практической конференции молодых ученых «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 2014).

План и аннотация диссертации обсуждены и одобрены на заседании ученого совета ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 28.10.2012 г., протокол № 10.

Результаты исследований доложены на общеинститутской конференции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 10.04.2015 г., протокол № 2.

#### **Публикации результатов исследований**

По теме диссертационного исследования опубликовано 9 работ, из них 4 – в рецензируемых периодических изданиях, рекомендованных ВАК для защиты докторских и кандидатских диссертаций, получен один патент на изобретение.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, список сокращений, список литературы. Библиография состоит из 211 источников, в том числе зарубежных – 166. Работа проиллюстрирована 23 рисунками и 5 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

**Клеточные линии.** В работе использовали перевиваемые клеточные линии животных (L929 – фибробласты мыши и СНО-K1 – овариальные клетки китайского хомячка, клон линии СНО) и человека (HeLa S3 – клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека, сублиния HeLa и HeLa ТК – клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека, сублиния HeLa), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

**Лабораторные животные.** Инбредных мышей линии BALB/c массой 16-18 г получали из питомника института и использовали для приготовления подкормочного (фидерного) слоя клеток, предназначенного для тиражирования *in vitro* гибридом-продуцентов МКА, а также на



этапах накопления МКА *in vivo* в виде асцитических жидкостей. Условия содержания лабораторных животных соответствовали нормативным документам «Санитарные правила устройства, оборудования и содержания экспериментально-биологических клиник (вивариев) №1045–73 Минздрав СССР». Все манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими нормами работы с ними, представленными в «Международном кодексе медицинской этики» (1994), Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/609ЕЕС.

**Питательные среды для культивирования клеточных линий.** В качестве основной среды для культивирования перевиваемых клеточных линий L929, СНО-K1, Hela ТК использовали полусинтетическую питательную среду DMEM. На ее основе готовили полную среду DMEM с 10 % ЭТС (ф. NuClone, Германия), pH 7,1-7,2 и всеми необходимыми добавками. Для снятия монослоя перевиваемых клеточных линий с поверхности пластика применяли коммерческие растворы 0,25 % трипсина и 0,02% версена, а для отмывания монослойных клеточных линий от смеси трипсин-версен - среду 199.

При культивировании гибридом-продуцентов МКА использовали среду RPMI-1640 с 15 % ЭТС с соответствующими добавками. Для всех этапов работы закупали среды и растворы производства ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» (Россия).

**Антигены возбудителя мелиоидоза.** В работе были использованы восемь образцов водно-солевых экстрактов (ВСЭ) из обеззараженных ацетоном микробных клеток возбудителя мелиоидоза, буркхольдерии II группы патогенности (шт. 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738) и семь образцов формамидных экстрактов (ФЭ) гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100, серии 5,7, 16, 19, 22, 23, 24.

Для приготовления ВСЭ к 1 г сухой бакмассы добавляли 60 мл 0,15 М раствора NaCl, pH 7,0 - 7,2. Взвесь бактерий помещали на магнитную мешалку на сутки, затем обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин при мощности 150 Вт и частоте 20 кГц. Разрушенные фрагменты клеток осаждали центрифугированием при 16000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую смесь растворимых антигенов *B. pseudomallei*, отделяли и в этом образце ВСЭ определяли содержание белка и полисахаридов. Образцы антигенов ампулировали по 0,5 мл и хранили при – 20 °С.

*Гликопротеин капсулы B. pseudomallei* был получен из обеззараженных бактерий *B. pseudomallei* 100 по методике формамидной экстракции полисахаридов бактерий (Fuller А.Т.,1938) в модификации Н.Н. Пивеня с соавторами (1991). В образцах антигенов определяли содержание белка и полисахаридов по методам Лоури и Дюбо соответственно (Lowry O. et. al., 1951, Dubois M. et. al., 1956). Значения pH в растворах антигенов приводили к показателю

7,0±0,1, затем осуществляли завершающую мембранную фильтрацию (фильтр 0,22 м, ф. Corning, Германия).

**Моноклональные антитела.** Источником получения моноклональных иммуноглобулинов в препаративных количествах являлись гибридомы-продуценты МКА к антигенам *B. pseudomallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. В работе были использованы восемь образцов мышинных МКА различной эпитопной направленности против антигенов *B. pseudomallei* из группы факторов вирулентности этого микроорганизма: МКА Ppm I, PpmII, 2A<sub>6</sub>, 2H<sub>7</sub> – против эпитопов Ag 8, гликопротеина капсулы с м.м. 800-900 kDa; МКА 2F<sub>11</sub> – против Ag 6 в составе ЛПС; МКА 3C<sub>6</sub>, 6A<sub>11</sub>, 6E<sub>7</sub> – против гликопротеина капсулы с м.м. 200 kDa. Все варианты МКА накоплены *in vivo* после введения  $5,0 \cdot 10^6$  гибридных клеток в брюшную полость мышей BALB/c, предварительно, за 5-7сут до внутрибрюшинной прививки, получавших в/бр 0,5 мл пристана. После образования асцитической жидкости ее извлекали и центрифугировали для осаждения клеточных элементов. Супернатант использовали для выделения МКА методом трёхкратного пересаживания белка сульфатом аммония при 50 % его насыщения (Goding J.W., 1986). Гомогенность препаратов МКА проверяли в РИД с антивидовой сывороткой, специфическую активность определяли с помощью непрямого варианта ТИФМ, для работы отбирали образцы с активностью не менее, чем  $1 \cdot 10^{-5}$  -  $1 \cdot 10^{-7}$

Все образцы МКА подвергали изотипированию, которое выявило принадлежность четырех из них к классу IgM (PpmI, 3C<sub>6</sub>, 6A<sub>11</sub>, 6E<sub>7</sub>) и четырех – к IgG (PpmII, 2A<sub>6</sub>, 2H<sub>7</sub>, 2F<sub>11</sub>).

Затем испытуемые образцы МКА стерилизовали методом мембранной фильтрации с использованием фильтров с величиной пор 0,45 м (Corning, Германия), ампулировали и сохраняли при – 20 °С до момента использования. Концентрацию белка в растворе МКА определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

**Условия работы с перевиваемыми клеточными линиями.** Все этапы работы с перевиваемыми линиями клеток выполняли в условиях культурального бокса, оборудованного специализированным ламинарным шкафом с горизонтальным потоком стерильного воздуха (тип «защита продукта»), инвертированным микроскопом, СО<sub>2</sub>-инкубатором, деионизатором воды, низкоскоростной центрифугой, малым биохранилищем культур, комплексом аппаратов для криоконсервирования культур клеток (Фрешни Р. Я., 2011).

**Размораживание клеточных линий.** Ампулы с криоконсервированной культурой клеток любой линии извлекали из биохранилища и быстро помещали в теплую водяную баню (37 °С). Размораживание осуществляли в течение 2-3 мин, содержимое ампулы переносили в центрифужную пробирку со средой 199 и взвесь клеток центрифугировали при 800 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в полной

среде выращивания конкретной линии клеток и переносили в культуральные пластины для дальнейшего масштабирования популяции. Для культивирования клеток использовали пластиковую посуду различного формата для работы с клеточными культурами (Multiple well plates, фирмы Costar). Контроль жизнеспособности клеток после размораживания выполняли с помощью теста на исключение красителя трипанового голубого (Вилсон Э., 1989).

**Режим культивирования клеточных линий.** Популяции клеток культивировали при 37 °С в атмосфере 5-7 % CO<sub>2</sub> и влажности 70-80 %. Интенсивность роста клеток контролировали при просмотре лунок пластин в инвертированном микроскопе. Смену среды и пересевы выполняли каждые 3-4 сут, кратность посева зависела от паспортных данных каждой линии клеток. При подготовке к пересеву монослойных линий использовали методику трипсинизации для отделения клеток от поверхности пластика (Методы культивирования клеток: Сб. науч. тр. – Л., 1988).

Контроль состояния культивируемых популяций производили ежедневно, просматривая высеvy с помощью инвертированного микроскопа при различном увеличении объекта (40<sup>x</sup>, 100<sup>x</sup>, 200<sup>x</sup>, 320<sup>x</sup>) и оценивая цвет и прозрачность среды выращивания. Для оценки состояния клеток использовали критерии: 1) изменение морфологии клеток по сравнению с ростом паспортизированной культуры; 2) изменение функционального состояния клеток в части способности формировать монослой.

**Условия хранения клеточных культур.** Вне периодов экспериментальных работ культуры клеток постоянно сохраняли при – 196 °С в биохранилище с жидким азотом ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в криоконсервированном состоянии. При подготовке клеток к криоконсервации в качестве защитной среды применяли среду RPMI-1640 с 20 % ЭТС и 7 % ДМСО (Хэй Р., 1989). При замораживании популяций применяли методику дробного автоматизированного понижения температуры до – 70 °С с последующим погружением пластиковых ампул с клетками в жидкий азот.

**Учет результатов.** Фоторегистрацию результатов опытов выполняли с помощью цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз. Во всех случаях исследуемые объекты фотографировали без дополнительного окрашивания.

Статистическую обработку результатов опытов проводили с использованием компьютерных программ «Statistica 6.0», «Microsoft Office Excel 2003», «FastStone Image Viewer», «StatPlus 2009».

## Результаты исследования и обсуждение

### Оптимизация условий подготовки перевиваемых клеточных линий для применения в тестах по определению токсичности антигенов *B. pseudomallei in vitro*

До начала основных экспериментов был выполнен подготовительный этап работы, включавший ряд последовательных разделов: выведение клеточных линий из криоконсервированного состояния, определение сроков их адаптации к предлагаемым условиям выращивания, изучение морфологии и функциональных особенностей каждой линии, определение сроков формирования монослоя для линий с монослойным характером роста (L929, CHO-K1, HeLa TK) и предельно допустимого срока наблюдения за культурами в условиях отсутствия признаков истощения среды выращивания.

Установлено, что выведенные из криоконсервированного состояния популяции клеток линий животного (L929, CHO-K1) происхождения и человека (HeLa TK, HeLa S3) сохраняли жизнеспособность на высоком уровне: более 90%. Выявлено также, что через 2 недели клетки полностью адаптируются к выбранным условиям культивирования и восстанавливают пролиферативную активность. К этому моменту состояние популяций позволяет начать их масштабирование для последующего выполнения тестов по определению цитотоксичности различных антигенов.

При работе с интактными культурами клеток была изучена не только их типичная морфология, но и проведена оценка функционального состояния популяций в части способности прикрепляться к поверхности пластика и формировать полноценный монослой на дне лунки. По результатам ежедневного просмотра высевок был определен срок формирования равномерного монослоя, равный одним суткам.

Типичная морфология интактных клеток в монослойных (L929, CHO-K1, HeLa TK) и полусуспензионной (HeLa S3) культурах коллекционных линий представлена на рисунке 1.

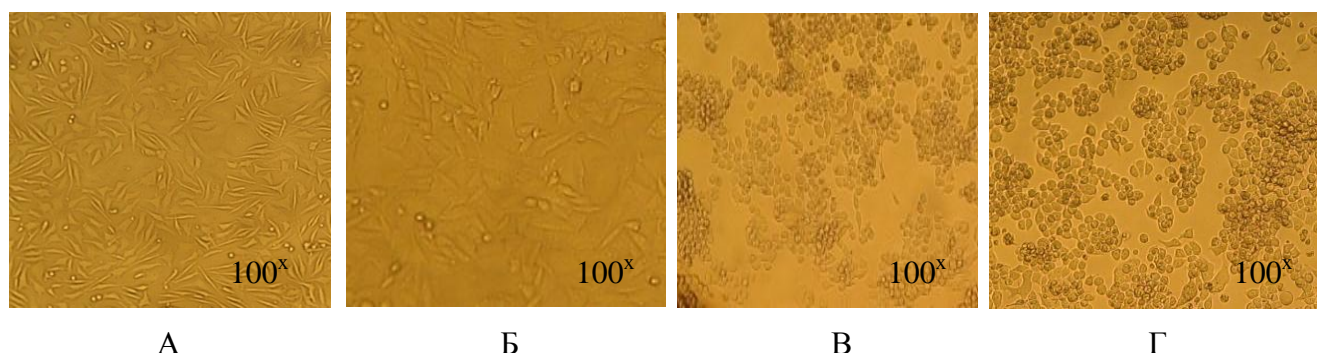


Рисунок 1 – Морфология интактных клеток различных линий, использованных в работе: А – мышечные фибробласты L929; Б – овариальные клетки китайского хомячка CHO-K1; В и Г – клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека сублинии HeLa (HeLa TK и HeLa S3 соответственно).

Кроме того, на этапе подготовки была изучена динамика роста каждой популяции. Так, при изучении динамики роста перевиваемой клеточной линии L929 (или CHO-K1) для культивирования использовали 12-ти луночные пластины. Свеже трипсинизированную культуру одной из этих линий вносили в ряд лунок пластины, по  $3,2 \cdot 10^5$  клеток в каждую лунку в объеме 1 мл среды DMEM. Через сутки при просмотре высевок регистрировали на дне лунок сформированный монослой клеток. Затем в первой лунке проводили трипсинизацию культуры для снятия всего монослоя и подсчета клеток в суточной пробе. Такую процедуру воспроизводили каждые последующие сутки. Результаты этих опытов свидетельствовали о том, что в течение первых трех суток признаки истощения среды культивирования отсутствуют. Динамика роста популяций представлена на рисунке 2. В таких условиях возможен корректный учет результатов воздействия антигенов на клетки-мишени. На основании этих данных срок наблюдения в проводимых экспериментах не превышал 3 суток.

Для эпителиоидной карциномы шейки матки человека, сублинии HeLa (HeLa S3 и HeLa ТК), обладающих более быстрой динамикой размножения, подбирали такую посевную дозировку клеток в каждую лунку, которая не приводила к ускоренному истощению культуральной среды. Темпы роста сублиний HeLa существенно отличались от темпов роста линий животного происхождения. В связи с этим, потребовалась коррекция посевных дозировок в сторону снижения числа клеток индикаторных культур сублиний HeLa в каждой лунке. Результаты второй серии опытов представлены на рисунке 3.

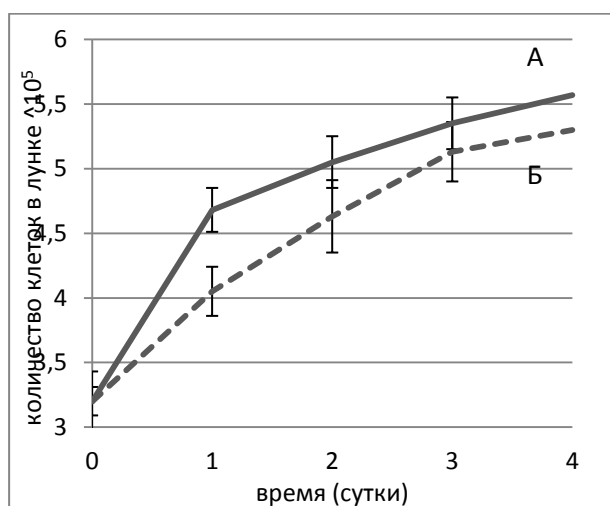


Рисунок 2 – Динамика нарастания численности клеток А – L929, Б – CHO-K1 со стартовой посевной дозой  $3,2 \cdot 10^5$ .

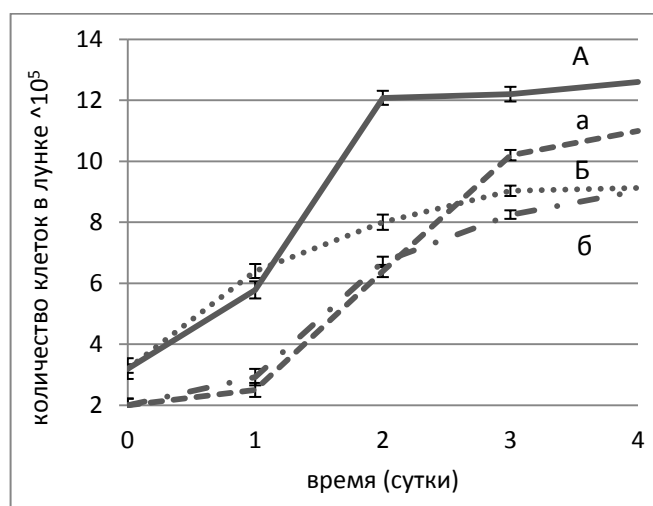


Рисунок 3 – Динамика нарастания численности клеток в течение всего срока эксперимента А – HeLa S3 со стартовой посевной дозой  $3,2 \cdot 10^5$ , а – HeLa S3 со стартовой посевной дозой  $2,0 \cdot 10^5$ , Б – HeLa ТК со стартовой посевной дозой  $3,2 \cdot 10^5$ , б – HeLa ТК со стартовой посевной дозой  $2,0 \cdot 10^5$

В целом, возможность работы с паспортизированными клеточными линиями с известными свойствами в значительной степени способствовала корректному проведению подготовительного этапа исследований и последующей стандартизации условий выполнения тестирования антигенов возбудителя мелиоидоза на клеточной модели *in vitro*. Основой для разработки информативной, воспроизводимой и экономичной модели выявления токсичных компонентов в различных образцах антигенов *B. pseudomallei* являлось применение основных принципов методов управляемого культивирования.

После проведения выборочной проверки эффективности применения разработанной клеточной модели были созданы условия для начала исследований по проверке возможной токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза.

### **Изучение цитотоксических свойств антигенных комплексов *B. pseudomallei***

Для изучения свойств цитотоксичности и цитопатогенности возбудителя мелиоидоза были использованы сложные по составу смеси антигенов: комплекс водорастворимых антигенов (ВСЭ) бактериальных клеток возбудителя мелиоидоза (*B. pseudomallei*, штаммы 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738), а также образцы гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100 с м.м. 200 kDa.

При определении токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза применяли методику прямого контакта испытуемых антигенов с клетками-мишенями. Критериями токсического воздействия являлись: морфофункциональные изменения клеток, снижение темпов роста и размножения, гибель клеток. Проявлением острой цитотоксичности являлась массовая гибель 50% клеток-мишеней и более по сравнению с контролем, а проявлением цитопатогенного эффекта - гибель менее 50 % клеток индикаторных культур по сравнению с контролем. При оценке результатов учитывали также фактор времени контакта антигенов с клетками, концентрации вносимых веществ в среду их выращивания, морфологические изменения клеток (удлиненные, округлые, увеличенные в объеме, полигональные), появление внутриклеточных включений, разрушенных клеток, их теней, детрита в межклеточных пространствах, участков свободной поверхности пластика вследствие потери клетками адгезивных свойств. Установлено, что при минимальном цитопатогенном воздействии антигена изменения, происходившие в монослое, были незначительными и касались прежде всего формы клеток-мишеней.

Для множественного скрининга антигенов возбудителя мелиоидоза в микроварианте теста цитотоксичности на модели перевиваемых клеточных линий L929 и CHO-K1 использовали 24-луночные пластины, в лунки которых вносили по  $1,6 \cdot 10^5$  клеток в объеме 0,5 мл среды. Через сутки проводили визуальный контроль образования монослоя. Затем в опытные лунки, с постоянной концентрацией клеток, вносили один из вариантов стерильных образцов антигенов,

по 40 мкл, что соответствовало по полисахаридной нагрузке 0,2-0,3 мг в каждой лунке. День внесения антигена в лунки с монослойной культурой считали 0 днем. В качестве контроля на каждой пластине оставляли лунки с интактной культурой.

Динамика гибели клеток-мишеней L929 и CHO-K1 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* одного из штаммов свидетельствовала о том, что комплексные водорастворимые антигены (ВСЭ) *B.pseudomallei* проявили различную степень цитотоксичности и цитопатогенности в отношении индикаторных культур L929 и CHO-K1. Наиболее выраженный цитотоксический эффект при контакте с индикаторными культурами оказали ВСЭ *B.pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361. Отличия в снижении жизнеспособности клеток линий L929 и CHO-K1 по сравнению с контролем были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ).

На рисунках 4 и 5 приведены относительные показатели жизнеспособности индикаторных культур L929 и CHO-K1 при прямом контакте ВСЭ *B.pseudomallei*.

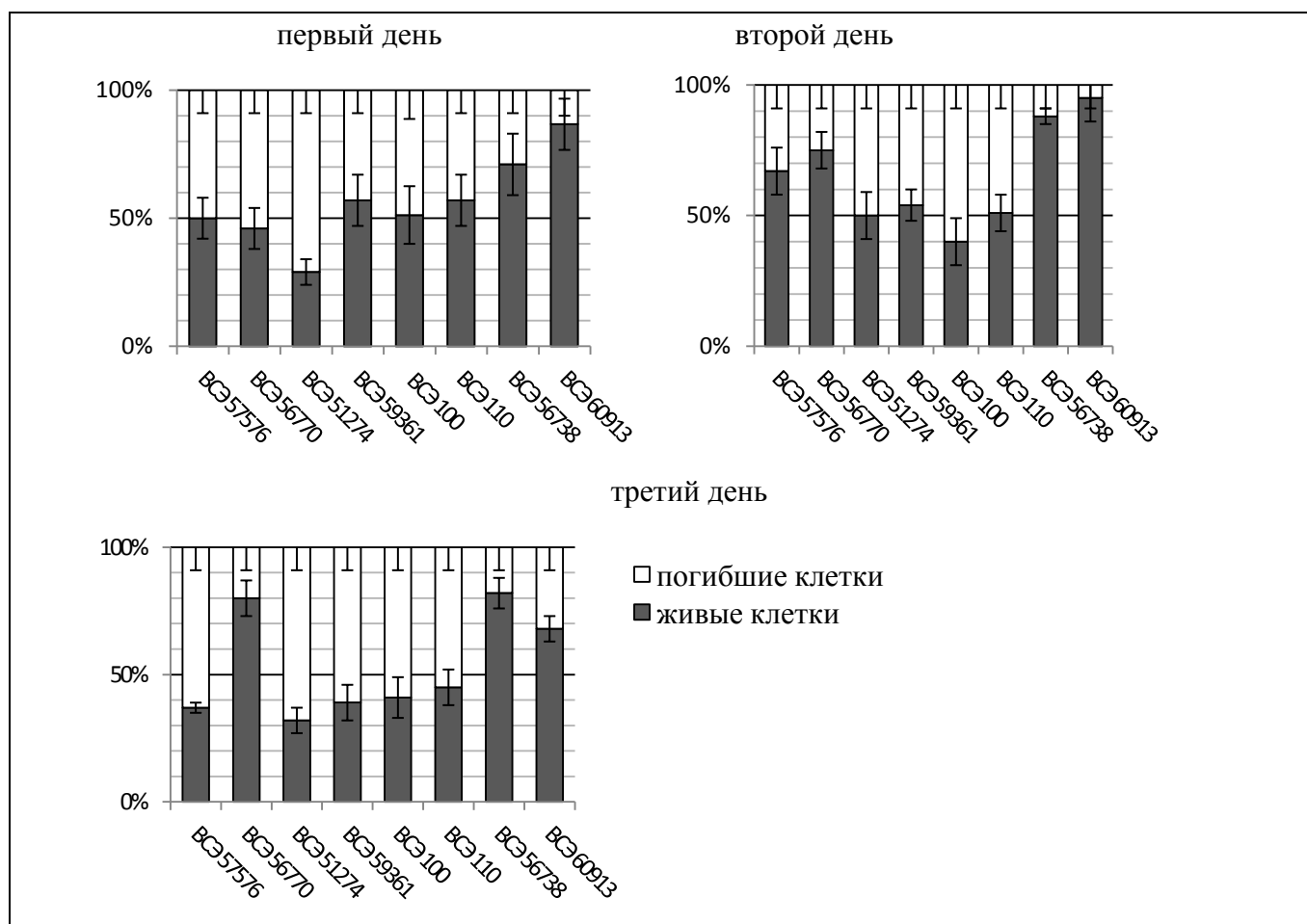


Рисунок 4 – Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослойной клеточной культуре L929 при контакте с ВСЭ в течение всего срока эксперимента.

Опыты по выявлению токсичности формамидных экстрактов (ФЭ) - гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100 серий 5, 7, 16, 19, 22, 23, 24, на модели клеткок-мишеней L929 и СНО-К1 показали, что образцы ФЭ *B. pseudomallei* 100 не обладали выраженной токсичностью, а проявили различную степень цитопатогенности. Относительные показатели гибели клеток находились в диапазоне значений от 1% до 20%, при этом отмечены изменения морфологии клеток обеих линий. Проявлений острого токсического эффекта при работе с различными сериями гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* (антиген 200 kDa) не выявили.

Скрининг антигенов возбудителя мелиоидоза в тесте микроцитотоксичности на перевиваемых клеточных линиях человека (сублинии HeLa) проводили по единой схеме: в 24-луночные пластины вносили культуру клеток в концентрации и объеме равную расчетным величинам для пластин данного формата: по  $1,0 \cdot 10^5$  клеток в объеме 0,5 мл в каждую лунку плюс 40 мкл одного из антигенов *B.pseudomallei*.

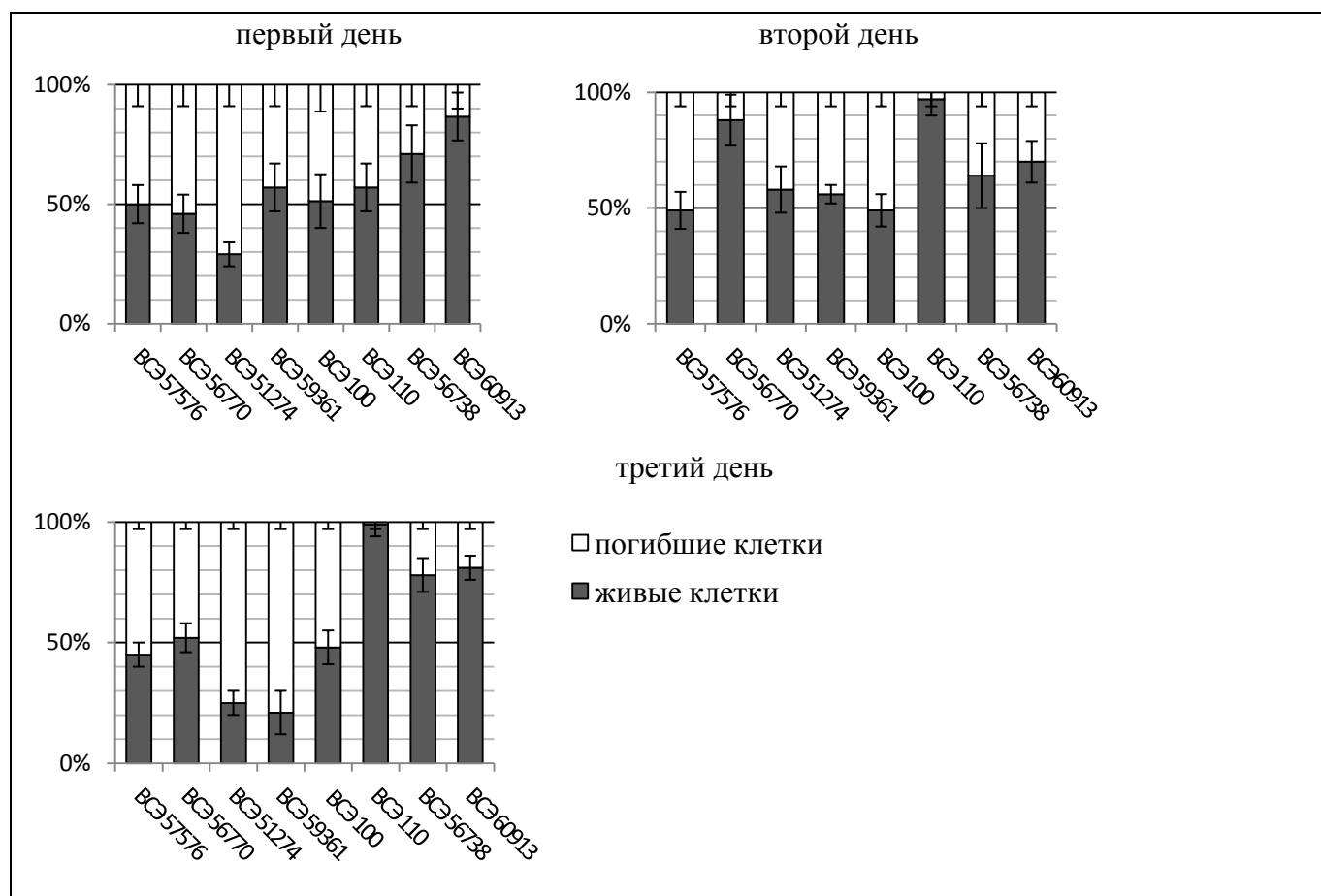


Рисунок 5 – Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослое клеточной культуры СНО-К1 при контакте с ВСЭ в течение всего срока эксперимента.

Использование клеточных линий HeLa S3 и HeLa ТК в качестве мишеней для выявления токсичности антигена возможно только в ограниченном объеме. Рассматривать эти линии в



качестве индикаторных перевиваемых клеточных моделей следует с осторожностью, так как при работе с ними затруднена стандартизация условий проведения опытов и их воспроизводимость.

Таким образом, в результате выполнения ряда серий опытов, в каждой из которых использовали одну из линий клеток для проверки всех образцов антигенов, были получены данные о преимуществах использования фибробластов мыши (L929) и овариальных клеток китайского хомячка (СНО-К1). Эти линии животного происхождения проявили себя как более «технологичные» в работе, обеспечивая высокий уровень воспроизводимости результатов. В связи с этим, было принято решение рассматривать их в качестве двух основных индикаторных линий при тестировании потенциально токсичных компонентов бактериальных клеток патогенных буркхольдерий.

Что касается перевиваемых линий человека HeLa S3 и HeLa ТК, следует отметить, что условия работы с ними оптимизированы, определены те варианты экспериментов, в которых они могут явиться линиями выбора.

#### **Эффективность применения мелиоидозных МКА различной эпитопной направленности в качестве цитопротекторов *in vitro***

В экспериментах по оценке протективных свойств МКА использовали образцы иммуноглобулинов, выделенные из асцитических жидкостей мышей BALB/c. Все варианты МКА, были охарактеризованы по изотипу, эпитопной направленности, концентрации белка, специфической активности в ТИФМ. Для работы отбирали образцы МКА с активностью в ТИФМ не менее  $1 \cdot 10^{-5}$  -  $1 \cdot 10^{-7}$ . Были проверены следующие варианты моноклональных иммуноглобулинов: 1) МКА, взаимодействующие с эпитопами гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* с м.м. 800 kDa (Аг 8 по классификации Н.Н.Пивеня): PpmI (IgM), PpmII (IgG), 2A<sub>6</sub> (IgG), 2H<sub>7</sub> (IgG); 2) МКА против эпитопов гликопротеина капсулы с м.м. 200 kDa: 3C<sub>6</sub> (IgM), 6A<sub>11</sub> (IgM), 6E<sub>7</sub> (IgM); 3) МКА 2F<sub>11</sub> (IgG) против эпитопов Аг 6 в составе ЛПС этого микроорганизма.

Протективный потенциал индивидуальных образцов МКА оценивали по результатам реакции цитотоксичности, выполнявшейся на модели индикаторных культур клеток линий L929 и СНО-К1.

Для постановки опытов использовали антигены с подтвержденной токсичностью: ВСЭ *B. pseudomallei* 100, 57576, 51274, 59361. Достоверное цитотоксическое воздействие этих антигенов на индикаторные культуры регистрировали в течение всего срока наблюдения ( $p < 0,05$ ). Перед постановкой основных опытов все образцы иммуноглобулинов были проверены

на наличие проявлений токсичности в отношении суточного монослоя интактных клеточных культур L929 и СНО-К1. Цитотоксического воздействия антител на клетки-мишени не выявили.

Эксперименты по нейтрализации токсичных компонентов в составе водорастворимых антигенов возбудителя мелиоидоза были выполнены согласно следующей схеме с использованием двух линий клеток (L929 и СНО-К1): свежетрипсинизированную культуру пересеивали в 24-луночные пластины, по  $1,6 \cdot 10^5$  клеток в объеме 0,5 мл в каждую лунку. Через сутки после образования монослоя в опытные лунки вносили заранее проинкубированную при  $37^\circ\text{C}$  в течение 1 ч смесь 40 мкл антигена с одним из вариантов антител в дозировке по белку 1мкг, 0,5 мкг, 0,25мкг. День постановки опыта считали 0. В течение 3 суток ежедневно оценивали качественные и количественные характеристики популяций клеток, просматривая их в инвертированном микроскопе и определяя количество клеток с помощью камеры Горяева. В качестве обязательных контролей в данных экспериментах использовали: 1) контроль интактной культуры клеток и 2) контроль, подтверждающий токсическое воздействие антигена на клетки (интактные клетки + один из антигенов).

Установлено, что практически во всех случаях использование МКА в дозировке 1 мкг не давало положительного эффекта, а в некоторых из них было отмечено подавление роста клеток и снижение численности популяции. Наиболее эффективная защита индикаторных клеток была зарегистрирована в случаях применения МКА в дозировке 0,5 мкг, реже при снижении до 0,25 мкг.

В результате выполнения данного раздела были получены доказательства того, что практически все варианты МКА обладали индивидуальным профилем активности в отношении компонентов смеси растворимых антигенов *B. pseudomallei* 100, 57576, 51274, «узнавая» гомологичные им эпитопы в каждой из этих антигенных смесей в различные сроки наблюдения и в зависимости от использованной дозировки того или иного моноклонального иммуноглобулина, способствуя увеличению числа выживших клеток в тесте микроцитотоксичности по сравнению с контролем антигена.

Так, к концу третьих суток наблюдения в опыте с антигеном *B. pseudomallei* 100 положительные результаты были получены при использовании шести различных вариантов МКА, взятых в дозировке 0,5 мкг, из восьми использованных в работе, в числе которых имели место антитела из трех условных групп, то есть было зарегистрировано достоверное увеличение числа жизнеспособных клеток по сравнению с контролем токсичности антигена ( $p < 0,05$ ) (рис. 6). В опытах с антигенами *B. pseudomallei* 57576, 51274 к концу срока наблюдения были зарегистрированы достоверные положительные результаты в случаях применения четырех из восьми и пяти из восьми вариантов МКА в дозировке 0,5 мкг соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 7, 8).

При этом нейтрализацию токсических компонентов в составе антигена *B. pseudomallei* 57576 обеспечивали МКА, взаимодействующие с эпитопами гликопротеина с м.м. 800 kDa (Ag8) и антигена 200 kDa, а в опыте с антигеном *B. pseudomallei* 51274 нейтрализующую активность проявили МКА из состава трех групп специфичности ( $p < 0,05$ ).

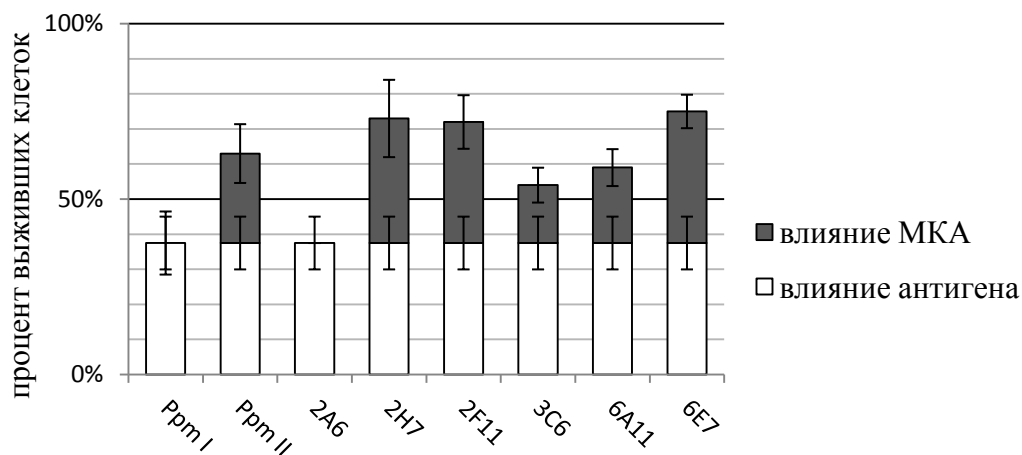


Рисунок 6 – Результаты проверки протективных свойств МКА, выраженные в относительных величинах значений числа выживших индикаторных клеток линии L929 по сравнению с контролем (Аг - ВСЭ *B. pseudomallei* 100).

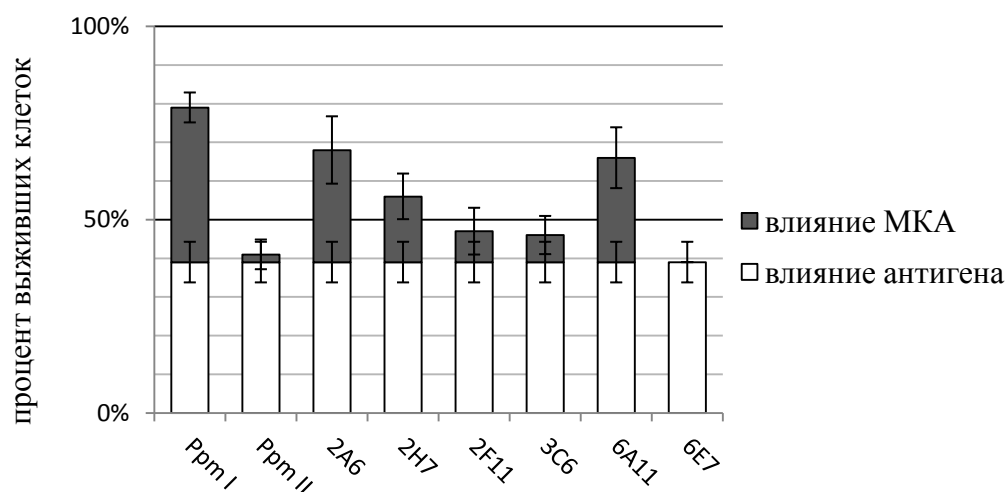


Рисунок 7 – Результаты проверки протективных свойств МКА, выраженные в относительных величинах значений числа выживших индикаторных клеток линии L929 по сравнению с контролем (Аг - ВСЭ *B. pseudomallei* 57576).

Данные, полученные при оценке протективного потенциала МКА в отношении антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* 59361 существенно отличались от изложенных выше. Несмотря на то, что этот антигенный комплекс обладал подтвержденной токсичностью, в его составе практически отсутствовали эпитопы, гомологичные тем вариантам МКА, которые были использованы в работе. Набор растворимых антигенов данного штамма возбудителя мелиоидоза не

соответствовал профилю специфической активности большинства использованных в работе вариантов МКА, что обусловило низкую эффективность их применения.

Итогом выполнения завершающего этапа исследований явились полученные данные о способности индивидуальных образцов МКА защищать индикаторные клетки от токсического воздействия антигенов *B. pseudomallei*, что демонстрирует возможность использования

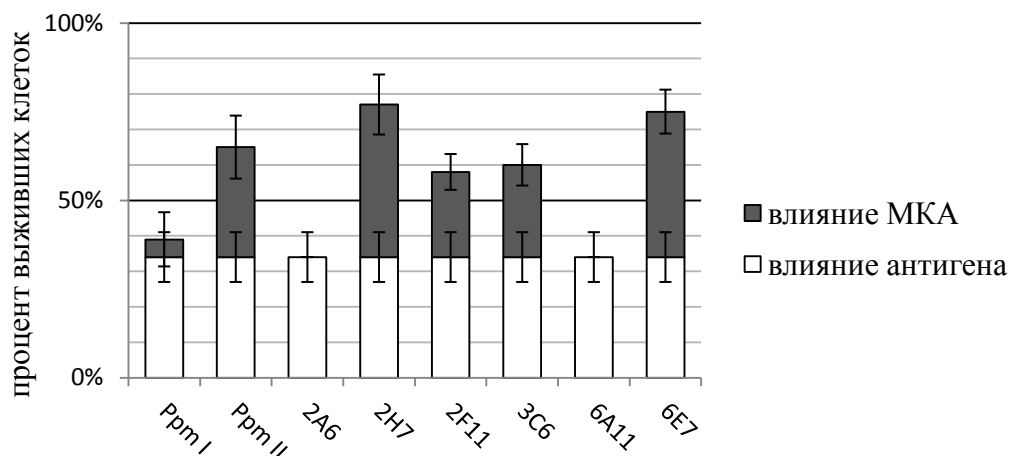


Рисунок 8 – Результаты проверки протективных свойств МКА, выраженные в относительных величинах значений числа выживших индикаторных клеток линии L929 по сравнению с контролем (Аг - ВСЭ *B. pseudomallei* 51274).

клеточной модели *in vitro* для получения достоверной информации о вариантах антител с наиболее высоким протективным потенциалом, на которые следует ориентироваться при создании экспериментальных смесей моноклональных иммуноглобулинов, так называемых «коктейлей», способных защитить макроорганизм от токсических компонентов микробных клеток.

В целом, выполнение перечисленных выше этапов работы позволило в полном объеме выполнить все задачи исследования и реализовать поставленную цель диссертационной работы.

### Выводы

1. В результате сравнительного изучения свойств коллекционных перевиваемых клеточных линий животных (L929 и CHO-K1) и человека (HeLa S3 и HeLa TK) установлено, что наиболее эффективной моделью для оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* являются монослойные клеточные линии мышинных фибробластов L929 и овариальных клеток китайского хомячка CHO-K1.

2. Разработаны оптимизированные условия постановки теста микроцитотоксичности, предназначенного для выявления *in vitro* токсичных компонентов в

биологически активных комплексных антигенах, изолированных из микробных клеток возбудителя мелиоидоза.

3. Основными критериями оценки цитотоксичности и цитопатогенности исследуемых образцов антигенов возбудителя мелиоидоза являются морфофункциональные изменения индикаторных культур, а также абсолютные и относительные показатели динамики гибели клеток-мишеней в течение всего срока наблюдения (3 суток).

4. Впервые представлены доказательства того, что мелиоидозные моноклональные антитела к антигенам капсулы (Ag 8 и 200kDa) и ЛПС(Ag6) *Burkholderia pseudomallei* являются эффективными цитопротекторами, способными защитить клетки-мишени от гибели, обусловленной токсическим воздействием на них антигенами данного микроорганизма.

5. Показателями стабилизации свойств индикаторных культур, выведенных из криоконсервированного состояния, прошедших двухнедельный период адаптации к условиям культивирования, необходимо считать способность популяции формировать монослой в течение суток, восстановление пролиферативной активности и типичной морфологии клеток.

#### **По теме диссертации опубликованы следующие работы:**

##### **а) статьи в журналах, рекомендованных ВАК**

1. Пименова, Е.В. Применение перевиваемой клеточной линии HeLa S3 для оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза / Е.В. Пименова, Н.П. Храпова, Л.П. Кнышова // Мед. академ. журн. Матер. II всероссийской науч. конф. молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». – Санкт-Петербург, 2012. – С. 335-337.

2. Храпова, Н.П. Оценка токсичности различных антигенов возбудителя мелиоидоза на модели перевиваемых клеточных культур *in vitro*/ Н.П. Храпова, Е.В. Пименова, Л.В. Ломова // Вестник ВолгГМУ, вып. 2 (42), 2012. – С.72-74.

3. Пименова, Е.В. Оценка цитотоксичности и цитопатогенности гликопротеина капсулы *Burkholderia pseudomallei* 100 на модели перевиваемой клеточной культуры / Е.В. Пименова, Н.П. Храпова // Инфекция и иммунитет. – 2014.- Том 4, №1. – С.85.

4. Пименова, Е.В. Влияние водно-солевых экстрактов *Burkholderia pseudomallei* на рост и развитие популяции перевиваемой клеточной культуры линии мышинных фибробластов L929 / Е.В. Пименова, Н.П. Храпова // Матер. VI Ежегод. Всерос. Конгр. по инфекционным болезням. – Москва, 2014г. – С.242.

##### **б) тезисы научных конференций**

1. Храпова, Н.П. Клеточная модель оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* / Н.П. Храпова, Е.В. Пименова, Л.В. Ломова // В сб.: Актуальные проблемы

предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ. Матер. X межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ, Ставрополь, 5-6 октября 2010 г. – С.237-238.

2. Пименова, Е.В. Разработка способа оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* / Е.В. Пименова // В сб.: 69-ой открытой науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с междунар. участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 27-30 апреля 2011 г. – С.179-180.

3. Пименова, Е.В. Применение перевиваемых клеточных линий для оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза / Е.В. Пименова, Н.П. Храпова, Л.В. Ломова // Матер. III науч.-практ. школы-конф. молодых ученых и специалистов НИО Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности», Оболensk, 31 мая – 2 июня 2011. – С. 293-296.

4. Пименова, Е.В. Изучение цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза на модели перевиваемой клеточной культуры Hela S3 / Е.В. Пименова, Н.П. Храпова // Матер. XX Юбилейного конгр. «Человек и лекарства», Москва, 15-19 апреля 2013. – С. 249.

5. Пименова, Е.В. Применение теста микроцитотоксичности для оценки протективного потенциала мелиоидозных МКА / Е.В. Пименова // Матер. V Ежегодного Всерос. Конгр. по инфекционным болезням, Москва, 25-27 марта 2013г. – С.314-315.

#### **в) авторские свидетельства, патенты на изобретения**

1. Пат. 2465592 Российская Федерация. Способ определения цитотоксичности антигенов *Burkholderia pseudomallei in vitro* / Н.П. Храпова, Е.В. Пименова, Л.В. Ломова; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; заявл. 06.06.2011; опубл. 27.10.2012.

#### **Список сокращений, используемых в тексте**

АГ – антиген

Аг 8 – антиген 8

Аг 6 – антиген 6

АЖ – асцитическая жидкость

АТ – антитела

ВСЭ – водно-солевой экстракт

ДМСО – диметилсульфоксид

ЛПС – липополисахарид

КЖ – культуральная жидкость

м.к. – микробная клетка

МКА – моноклональные антитела

м.м. – молекулярная масса

МФА – метод флуоресцирующих антител

РИД – реакция иммунодиффузии

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

ТИФМ – твердофазный иммуноферментный метод

ФЭ – формамидный экстракт

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЦТД – цитотоксическое действие

Ig – иммуноглобулины

kDa – килодальтон

**Пименова Екатерина Владимировна**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ АНТИГЕНОВ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА *IN VITRO* НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ  
КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой  
степени кандидата медицинских наук