

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ
ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

ПИМЕНОВА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Н.П. Храпова

Волгоград – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Экспериментальные модели для проверки токсических свойств биополимеров	13
1.2 Современное представление об антигенах <i>Burkholderia pseudomallei</i>	22
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Клеточные линии	33
2.2 Лабораторные животные	33
2.3 Питательные среды для культивирования клеток	34
2.4 Антигены, использованные в работе	35
2.5 Методы биохимического анализа антигенов	36
2.6 Условия работы с перевиваемыми клеточными линиями	36
2.7 Размораживание клеточных линий	36
2.8 Условия культивирования клеточных линий	37
2.9 Методика снятия монослоя клеток с поверхности пластика	38
2.10 Условия хранения клеточных культур	39
2.11 Гибридомы-продуценты МКА, использованные в работе	40
2.12 Очистка МКА, их характеристика, условия хранения экспериментальных образцов	41
2.13 Методы регистрации и обработки результатов опытов	42
ГЛАВА 3 ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОДГОТОВКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРНЫХ КУЛЬТУР В ТЕСТАХ МИКРОЦИТОТОКСИЧНОСТИ	43

3.1 Изучение условий культивирования перевиваемых клеточных линий, использованных в работе	43
3.2 Подбор посевной дозы клеток в лунки пластин различного формата для монослойных культур клеток-мишеней линий L929 и CHO-K1	45
3.3 Подбор посевной дозы клеток-мишеней человека HeLa S3 и HeLa ТК в лунки пластин различного формата	47
ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ <i>B. PSEUDOMALLEI</i>	52
4.1 Определение цитотоксичности и цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза на перевиваемых клеточных линиях L929, CHO-K1, HeLa ТК, HeLa S3	53
4.2 Множественный скрининг антигенов возбудителя мелиоидоза в микроварианте теста цитотоксичности на популяциях перевиваемых клеточных линий L929 и CHO-K1	54
4.2.1 Изучение динамики гибели клеток-мишеней L929 и CHO-K1 при контакте с водно-солевыми экстрактами возбудителя мелиоидоза в тесте микроцитотоксичности	55
4.2.2 Изучение динамики гибели клеток-мишеней L929 и CHO-K1 при контакте с образцами формамидных экстрактов (ФЭ) гликопротеина капсулы <i>B. pseudomallei</i> 100	58
4.3 Множественный скрининг антигенов возбудителя мелиоидоза в микроварианте теста микроцитотоксичности на перевиваемых клеточных линиях человека (сублинии HeLa)	65
ГЛАВА 5 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЛИОИДОЗНЫХ МКА РАЗЛИЧНОЙ ЭПИТОПНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ В КАЧЕСТВЕ ЦИТОПРОТЕКТОРОВ <i>IN VITRO</i>	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
ВЫВОДЫ	91
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	92

ВВЕДЕНИЕ

Методы культуры ткани в последнее время получили широкое распространение во многих областях медицинской деятельности, в том числе и в прикладной микробиологии. В настоящее время количество клеточных культур для определения потенциальной цитотоксичности компонентов микробной клетки микроорганизмов увеличивается с каждым годом [7; 9; 16].

Создание клеточной модели для быстрой оценки безопасности веществ, применяемых *in vivo*, и скрининга цитопротекторных препаратов – актуальное направление исследований в области микробиологии, иммунологии и биотехнологии. Адекватность замены традиционной биопробы более технологичной клеточной моделью *in vitro* в случаях оценки биологической активности ряда бактериальных токсинов подтверждена экспериментально работами как отечественных, так и зарубежных авторов [3; 10; 14; 15; 24; 28; 38; 39; 40; 43; 89; 134; 205].

Преимущества работы с клеточными культурами связаны с возможностями использования коллекционных паспортизированных линий клеток с известными свойствами, изучением характера биологической активности тестируемых соединений непосредственно на клеточном уровне, возможностью оценки состояния клеток-мишеней «прижизненно», а не «post factum», одновременным тестированием большого числа биологически активных биополимеров при их минимальном расходе, получением результатов тестирования в течение относительно короткого промежутка времени, а также возможностью определения точной концентрации потенциально токсичного вещества, воздействующего на клетки индикаторной культуры и вызывающего тот или иной эффект [4].

Возбудитель мелиоидоза – *Burkholderia pseudomallei* ввиду его высокой патогенности для человека и животных занимает особое место в номенклатуре

опасных биологических агентов, входящих в список потенциальных средств террористических атак [29; 77; 182; 197].

Сведения об использовании перевиваемых линий клеток позвоночных различной видовой принадлежности в качестве мишеней для оценки токсических свойств биологически активных антигенных комплексов *B. pseudomallei*, отнесенных к группе факторов вирулентности возбудителя мелиоидоза, недостаточно изучены.

В то же время, 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*. Описанные случаи скоротечных форм 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).

Разработка эффективной клеточной модели *in vitro* для качественной и количественной оценки цитотоксичности или цитопатогенности индивидуальных образцов антигенов, причисляемых к наиболее перспективным компонентам экспериментальных вакцин, обеспечит получение 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 о возможности использования в качестве альтернативной модели перевиваемые клеточные линии животного и человека для изучения цитотоксического и цитопатогенного воздействия растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза.

Впервые в качестве индикаторных культур для выявления цитотоксичности антигенов *B. pseudomallei* в тесте микроцитотоксичности были использованы клетки двух сублиний человеческой эпителиодной карциномы шейки матки HeLa S3 и HeLa ТК. Выявлена достоверная корреляционная связь между показателями острой токсичности антигенов для клеточных линий человеческого и животного происхождения.

Установлена наиболее адекватная клеточная модель для изучения цитотоксичности и цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза и определены критерии оценки их воздействия на индикаторные культуры.

Впервые на модели монослойных перевиваемых клеточных линий L929 и СНО-К1 изучены протективные свойства мелиоидозных МКА против различных эпитопов антигенов, экспонированных на поверхности микробных клеток возбудителя мелиоидоза. Представлены доказательства достоверного увеличения числа живых клеток в случаях применения МКА в качестве цитопротекторов.

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 для оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro*, чувствительной, простой в исполнении, информативной, которая может быть использована 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 том, что продуценты двух вариантов МКА из восьми, применявшихся в работе, на этапе определения их протективного потенциала, доступны для использования, так как они были депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»:

1) Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* Bpm Vd-8 – продуцент моноклонального антитела 3C₆/A₉ к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под номером Н-30. Дата выдачи свидетельства о депонировании 22.10.2013.

2) Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. Bpm Vd-11 – продуцент моноклонального антитела 6A₁₁/G₁₂ к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под номером Н-41. Дата выдачи свидетельства о депонировании 16.09.2014.

Методология и методы исследования

Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам апробации альтернативных способов определения токсичности различных биополимеров *in vitro*.

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.

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» (Оболенск, 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).

Диссертационная работа выполнена в рамках государственной темы № 053-5-10 (№ гос. регистрации 01.2.010 01189).

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

Публикации результатов исследований

По теме диссертационного исследования опубликовано 10 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 8 таблицами.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Экспериментальные модели для проверки токсических свойств биополимеров

Успех ряда фундаментальных и прикладных исследований в биологии и медицине во многом определяется возможностью постановки опытов на животных. Однако общепринятые методы проверки токсичности *in vivo* трудоемки, длительны, дорогостоящи и требуют большого числа экспериментальных животных. При этом получаемые результаты не всегда воспроизводимы ввиду индивидуальных реакций биомоделей.

Исследования цитопатогенного воздействия ряда токсических веществ с использованием систем *in vivo* осложняются структурной и функциональной гетерогенностью клеток макроорганизма и не всегда могут быть использованы для раскрытия точных молекулярных механизмов действия токсиканта.

В последние десятилетия наметилась тенденция замены биопробных животных иными моделями *in vitro*. Для минимизации количества подопытных животных или полной их замены при изучении токсичности различных препаратов и соединений используют альтернативные биологические модели. Так, опубликованы результаты экспериментальных исследований свидетельствуют об успешном использовании в качестве альтернативных моделей беспозвоночных животных, гидробионтов, микроорганизмов, растений, изолированных перфузируемых органов, тканевых срезов, клеточных культур и суспензий клеток человека и животных [9; 12; 13; 16; 20; 31; 37; 42; 45; 87].

Внедрение альтернативных методов в токсикологические исследования происходит под контролем таких международных организаций, как Европейский центр по утверждению альтернативных методов (ECVAM), Интернациональный комитет центра по утверждению альтернативных методов (ICCVAM),

Европейское сообщество токсикологов *in vitro* (ISTIV), Итальянской ассоциации токсикологов *in vitro* (CELLTOX), Американской исследовательской организации скрининговых исследований (CYPROTEX) и других. В Европейском законодательстве (REACH) тестирование в условиях *in vitro* включено в перечень обязательных методов оценки для определения потенциально опасных веществ для здоровья человека и окружающей среды, которое вступило в силу с 2007 года [11; 71].

В нашей стране с 1999 года введен в действие Государственный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 «Оценка биологического действия медицинских изделий». Часть 5 этого документа «Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» посвящена вопросам определения *in vitro* биологической реакции клеток млекопитающих по определенным биологическим параметрам [7].

В настоящее время в лабораторной практике существуют несколько альтернативных методов для оценки цитотоксического потенциала химических и биологических веществ. Все методы определения цитотоксичности делят на две основные группы: компьютерное моделирование биохимических и молекулярных физико-химических процессов, для создания виртуальных экспертных систем (*in silico*) и лабораторное тестирование без использования животных (*in vitro*). Данные методы позволяют помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования потенциально токсичных веществ прежде всего на стадии их скринингового испытания, а также обеспечивают необходимую воспроизводимость результатов исследований и высокую чувствительность клеток-мишеней к токсическим веществам.

Согласно рекомендациям Агентства по защите окружающей среды США (EPA – Environmental Protection Agency) в части определения гено- и эмбриотоксичности испытуемых веществ также были предложены альтернативные методы взамен общепринятым тестам на животных *in vivo* в том

числе методы на модели оценки острой токсичности на рыбах, икре рыб и *in silico*.

Так, успешное исследование было выполнено с применением модели икры рыб [131; 176], посвященное регистрации процессов, происходящих на ранних стадиях развития эмбриона в условиях различных концентраций цитотоксического вещества.

Модель *in silico* дает возможность предсказать эффекты ряда потенциально токсичных веществ при изучении как острой, так и хронической токсичности лекарственных средств на основе компьютерного моделирования [150].

С 1970-х годов для определения потенциальной токсичности проб воды широко используют некоторые виды ресничных инфузорий рода *Tetrahymena*, например, *T. thermophila* и *T. pyriformis*, а в последние годы интенсивно развиваются исследования на рыбах семейства карповых (*Danio rerio*) и цихлид (*Tilapia*), в том числе для оценки токсичности лекарств и ксенобиотиков [148], которых используют как модельные пресноводные организмы в биологических и медицинских исследованиях.

Для исследования токсических свойств различных штаммов *Burkholderia ceracia* сотрудники ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт применяют клетки *T. pyriformis*. Группой авторов опубликованы данные о возможности использования данной модели для изучения факторов патогенности буркхольдерии III группы патогенности - *B. ceracia* [20].

Востребованной моделью для изучения патологического воздействия потенциально токсичных химических и биологических веществ в опытах *in vitro* являются культуры популяции клеток различного происхождения.

Так, ЕСВАМ разрешила использование эмбриональных стволовых клеток для оценки эмбриотоксичности, а также использование культур клеток животных и человека в соответствии с установленным требованием для определения наличия и критических параметров развивающейся интоксикации [19; 93]. Нужно отметить, что для изучения цитотоксического воздействия токсических веществ на клетки-мишени эмбрионального или опухолевого происхождения, результаты,

полученные в тесте микроцитотоксичности, достоверны в первые сутки, что связано с более высоким потенциалом роста и способностью легко адаптироваться к изменениям внешних факторов [88].

Мультицентровые оценки цитотоксичности в тесте *in vitro* (Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity – MEIC) показали, что тесты на определение цитотоксичности дают приблизительно близкие по значению результаты в отношении действия веществ на клеточном уровне по параметрам их роста и жизнеспособности [198]. Анализ данных MEIC также показал, что в ряде случаев более предпочтительно использовать в тестировании клетки животного и человека [19;115]. Тем более, что культуру клеток можно получить практически из любого органа или ткани человека или животного (взрослого или эмбриона). Нюанс данного метода – это требования к стандартизации качества культуры клеток.

В последнее десятилетие разработаны и внедрены принципы GLP для альтернативных методов: на 3-м Международном конгрессе, посвященном альтернативным методам и использованию животных в науке, выдвинута инициатива создания Good Cell Culture Practice (GCCP), проект который разработан и внедрен Европейским центром валидации альтернативных методов [103].

Используемые культуры клеток в тесте микроцитотоксичности могут быть разделены на два типа – первичные и перевиваемые культуры. Первичные клеточные культуры имеют морфологические и биохимические характеристики, исходных тканей, но результаты токсического воздействия, полученные на первичных культурах, не всегда воспроизводимы в связи с низкой однородностью культуры и из-за быстрой потери специализации клеток в условиях культивирования. Еще одним недостатком первичных клеточных популяций является относительно небольшое время культивирования. Например, если клетки получены из эмбриональных тканей, то они сохраняют свою нормальную морфологию и физиологию примерно в течение 50 генераций. Затем начинается процесс дегенерации клеток, и они постепенно погибают. В случае, если клетки

получены из тканей взрослого организма, клетки переживают в культуре еще меньше - около 20 (или даже менее) 17 генераций. Из сказанного выше понятно, что работать с постоянной клеточной культурой в ряде случаев намного легче, чем с первичными клетками. Тем не менее, оценка цитотоксичности на первичных клеточных культурах может быть единственно возможным методом для сравнительных исследований, выполняемых на некоторых специализированных тканях, взятых от различных видов животных, где клеточные линии и штаммы из тех же тканей отсутствуют [88].

Наиболее простой и доступной системой для оценки цитотоксичности и цитопатогенности *in vitro* являются перевиваемые клеточные линии. Сравнивая опыты, которые проводят на первичных клеточных культурах и эксперименты на перевиваемых клеточных линиях в условиях *in vitro*, можно выделить ряд преимуществ. Во-первых, в работе используют паспортизированные и стандартизированные однородные клеточные линии с известными свойствами, полученные из ряда государственных специализированных банков клеточных линий, выбор которых обусловлен областью их применения. При этом результаты, полученные на перевиваемых клеточных линиях, всегда воспроизводимы на всех этапах работы [17; 26; 36].

Во-вторых, перевиваемые клеточные линии легко выращивать, а результаты можно легко охарактеризовать по критериям оценки состояния клеток:

- 1) по изменению морфологии клеток и в отличие от морфологии клеток паспортизированной культуры;
- 2) по изменению функционального состояния клеток в части способности формировать монослой [88].

В третьих, исследования на культуре клеток дают результаты, позволяющие проводить количественную оценку, изучать зависимости «доза – эффект» и «структура – активность», а также возможность рассчитать минимально токсическую дозу на одну клетку.

В четвертых, возможность проведения скрининга одновременно нескольких потенциально токсических веществ в культуре клеток и непосредственно на

клетках органов человека, а также возможность прижизненного наблюдения за результатами прямого воздействия токсического вещества на культуру клеток.

В пятых, тесты в культуре клеток можно проводить в микроколичествах и контролировать результаты с достаточно высокой точностью, что облегчает определение токсической концентрации ксенобиотика [89].

Выбор объекта-мишени для исследования *in vitro* и метода, позволяющего быстро и специфически выявить взаимодействие потенциально токсических веществ с культурой клеток, зависит от целевой установки опыта. В настоящее время широко используют культуру клеток чистых линий, которые являются наиболее адекватными для разработки методов количественной оценки потенциально токсических веществ.

Оценка токсичности *in vitro* на перевиваемых клеточных линиях включает два основных метода определения цитотоксичности: первый – с использованием обычных кератиноцитов человека *NHK* и второй – с применением клеточных линий фибробластов мышей *BALB/c 3T3*. В качестве примера можно привести штамм мышинных L-клеток, который был получен после обработки фибробластов метилхолантреном. Позднее из этого штамма были клонированы клетки L929.

Эти методы являются подходящими для быстрой оценки наличия и степени цитотоксического эффекта, а также для вычисления стартовой дозы *in vivo* [116].

Безусловно, тесты *in vitro* для оценки цитопатогенного действия потенциально токсичных веществ нельзя рассматривать как единственный метод, но он становится хорошей альтернативой, если включить его в ряд других подходов. Прежде всего альтернативные методы *in vitro* должны включать целый набор тестов, характеризующих цитотоксичность, метаболизм, токсикокинетику и определение токсичности для клеток отдельных органов с последующем прогнозом для макроорганизма [147;149]. При использовании культур клеток как альтернативного метода *in vivo* возможно уменьшение количества лабораторных животных на 40% [181], а также установление максимально толерантной дозы на основе определения минимальной концентрации токсического вещества для клеток-мишеней, которая приводит к изменениям в клеточной морфологии.

Характерные свойства культур клеток, такие как гомогенность состава популяции, удлинение срока жизни, повышенная способность к делению, делает их наиболее приемлемым тест-объектом в микробиологии [177].

Есть несколько способов определения наличия и степени цитотоксичности на клеточных линиях: 1) регистрация изменений клеток с помощью микроскопической техники, 2) с помощью специального электронного прибора - счетчика частиц, 3) косвенно - путем измерения включения в клетки радиоактивных изотопов, 4) количественного определения общего белка с включенными хромогенными красителями или путем измерения метаболической активности клеточных ферментов.

Для интерпретации результатов прямого воздействия потенциально токсических веществ на клетки-мишени по параметрам «конечной точки» выполняют: подсчет количества клеток в популяции, определение жизнеспособных клеток-мишеней, изучение проницаемости мембраны, оценку метаболической функции клеток, измерение концентрации АТФ, внутриклеточного кальция, митохондриального мембранного потенциала и размера ядра. Методы «конечной точки» опубликованы в статье коллектива авторов из Ереванского государственного университета (Армения) [6].

Методы изучения токсичности веществ на модели перевиваемых клеточных линий используют во многих областях медицинской деятельности. Начиная с 70-х годов и по настоящее время метод *in vitro* наиболее широко применяют для изучения феномена местного раздражения вследствие воздействия стоматологических материалов – имплантатов. При этом используют культуры клеток различного происхождения и типа (в том числе и фибробластов десны человека) [61; 85; 86; 106; 117].

В частности, для понимания механизма местной токсичности в отношении клеток легких, был проведен скрининг различных веществ (табачный дым, дизельные выхлопы, различные виды пыли и волокна и др.) с помощью микроварианта теста цитотоксичности [67; 78; 92; 132; 211].

С начала развития клинической химиотерапии рака в 1946 г. использование системы *in vitro* стало основным методом скрининга всевозможных противоопухолевых соединений. Так, Тепкеева И.И. изучала противоопухолевую активность лекарственных растений на клеточных линиях рака легкого человека A549 и H1299, рака шейки матки человека HeLa, рака молочной железы (PMЖ) человека MCF-7 и MCF-10 и фибросаркомы человека HT 1080 [41].

Sadeghi-Aliabadi Н. с соавторами осуществили оценку цитотоксичности антибиотиков широкого спектра действия доксорубицина в комбинации с симвастатином, используемых в терапии рака [168].

Цитотоксичность карборанилсодержащих соединений была определена Данлыбаевой Г.А. с соавторами на модели нормальных и опухолевых клеточных культур различного органного происхождения. Ими были использованы клетки нормальной печени (Chang liver), опухолевые клетки карциномы легкого человека (А – 549), клетки диплоидной культуры ФЭЧ (фибробласты кожно-мышечной ткани эмбриона человека) [8].

Успешному применению перевиваемых клеточных линий в микробиологической практике предшествовала большая экспериментальная работа многих исследователей по изучению потенциально токсичных веществ на клеточной модели, что позволило не только лучше изучить механизмы, но и установить закономерности их взаимодействия с клетками-мишенями. Тесты *in vitro* с использованием клеточных линий предоставили полезную информацию о патогенезе некоторых заболеваний человека (например, заболеваний печени, целиакии) [50; 119].

В настоящее время культуры клеток широко используют в микробиологии и иммунологии при изучении цитотоксичности ряда компонентов микробных клеток возбудителей инфекционных заболеваний.

Так, Сальниковой О.И. было сделано сообщение об эффективности использования монослойной перевиваемой клеточной линии овариальных клеток китайского хомячка (СНО-K1) для изучения токсина холерного вибриона [38; 39], что послужило стимулом к дальнейшим исследованиям по изучению

токсинопродуцирующей способности холерного вибриона на модели культур клеток различного происхождения. Так Маркина О.В. для тестирования холерного токсина использовала семь разновидностей клеточных линий (СНО-K1, L-929, HEp-2, CaCo-2, M-Hela, MDCK (NBL-2) и McCoyB) и, основываясь на полученных данных, установила наиболее адекватную клеточную модель для изучения токсинов *V.cholerae* [23].

Guerrant R.L. с соавторами получили данные о влиянии энтеротоксинов холерного вибриона и кишечной палочки на морфологию клеток СНО-K1 [96].

Помимо холерного вибриона в микрокультуре клеток количественно определяли коклюшный токсин (КТ), а также изучали возможные реакции нейтрализации цитопатогенного действия КТ с помощью МКА к этому токсину на модели культуры клеток СНО [2; 3].

Сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора были опубликованы данные об использовании теста микроцитотоксичности *in vitro* для изучения активности препарата экзотоксина *A. P. aeruginosa* и цитопротективного действия МКА на модели клеток перевиваемых линий СНО-K1 и L929, что позволило установить суммарные антигенные нагрузки на мышей линии BALB/c в процессе иммунизации, используемых на этапе гибридной технологии [28].

Позже была опубликована работа Жуковой С.И. с соавторами, посвященная методике определения токсического воздействия бактериальных антигенов по степени угнетения сократительной функции инфузорий (*Paramecium caudatum*) в сравнении с чувствительностью тестирования этих же антигенов на клетках линий L-929 и СНО K-1 [31].

Ряд отечественных и зарубежных работ посвящено изучению дифтерийного токсина на модели перевиваемых клеточных культур. Так, Советова Г.П. с соавторами изучили влияние различных доз дифтерийного экзотоксина на клетки L929 и HeLa. Авторы выявили прямую корреляцию показателей «доза – эффект» дифтерийного токсина на эти перевиваемые клеточные линии [40].

Ранее были опубликованы данные сотрудников НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова И.И. о прямой зависимости между величинами биологической активности дифтерийного токсина в тестах *in vivo* на морских свинках и в тесте микроцитотоксичности *in vitro* на модели культуры клеток СНО. На основе полученных экспериментальных данных можно судить об использовании теста *in vitro* как одного из методов быстрой, воспроизводимой, экономичной оценки дифтерийного токсина, а также о специфичности и информативности данного теста [10].

Prior T.I. с соавторами исследовали корреляцию активности *Pseudomonas exotoxin A* (PE) в тесте *in vivo* на мышах и в тесте *in vitro* на клеточных линиях мышинных фибробластов L929, где цитотоксическое действие токсина в культуре клеток L929 оценивали путем измерения ингибирования синтеза ДНК. На основе анализа экспериментальных данных тест микроцитотоксичности оказался более чувствительным и воспроизводимым по сравнению с биологическим тестом на животных [157].

Jones A.L. с соавторами в эксперименте на перевиваемых клеточных линиях HeLa, СНО, A549 и Vero изучили внутриклеточную выживаемость *Burkholderia pseudomallei* [114].

Таким образом, изучение на практике альтернативных моделей с применением перевиваемых клеточных линий в тесте микроцитотоксичности на сегодняшний день актуально. Модель *in vitro* для оценки потенциально токсичных биополимеров соответствует современным требованиям биоэтики, полученные результаты воспроизводимы на всех этапах работы с применением стандартных паспортизированных клеточных линий для оценки цитотоксичности и цитопатогенности этих веществ.

1.2 Современное представление об антигенах *Burkholderia pseudomallei*

Burkholderia pseudomallei - этиологический агент мелиоидоза. Это заболевание относится к группе особо опасных бактериальных инфекций (ООИ),

характеризуется высокой летальностью, тяжелым течением. Средства специфической профилактики мелиоидоза до сих пор не разработаны, что делает возможным применение *B.pseudomallei* в качестве агента биотерроризма [35; 53; 64; 94; 152; 189; 194]. В связи с этим во многих странах, в том числе в Российской Федерации, Великобритании, США, Канаде, *B.pseudomallei* отнесена к категории В [63; 66; 94; 164; 202; 208]. Этим объясняется интерес к изучению возбудителя мелиоидоза. В то же время, следует отметить, что до настоящего времени *B. pseudomallei* никогда не была использована в таком качестве [133; 197].

На сегодняшний день *B. pseudomallei* отнесена к свободноживущим естественным обитателям почвы на территориях с влажным субтропическим климатом [18]. Эндемичными по мелиоидозу являются страны Юго-Восточной Азии, а также Китай, Индия, Австралия, Корея, Бразилия, Нигер, Иран, Сальвадор и ряд других островных стран Тихого и Индийского океанов [18; 69; 76; 91; 201].

В последнее время все чаще появляются сообщения о спорадических случаях заболеваний в неэндемичных районах, таких как Бразилия, Пуэрто-Рико и Новая Каледония [46; 52; 83; 124; 169]. Описаны случаи заболеваний мелиоидозом на юге Тайваня и в Китае [136; 144; 156; 174; 197; 203; 209].

B. pseudomallei – факультативный внутриклеточный патоген, который после попадания в макроорганизм может размножаться и сохраняться длительное время внутри макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов и некоторых «непрофессиональных» фагоцитов [77; 113]. Эта особенность *B. pseudomallei* играет важную роль в патогенезе мелиоидозной инфекции [203].

Мелиоидоз может проявиться в виде бессимптомного носительства, хронического заболевания или в виде молниеносной формы, осложненной септицемией с множественными некротическими поражениями внутренних органов (легкие, селезенка, печень) и мягких тканей [74; 77; 201]. В зависимости от локализации очагов клинические проявления и симптомы в начале заболевания могут быть различными [75; 201], что приводит к ошибочной постановке диагноза [160].

Обычно проявления мелиоидоза представлены острой, подострой и хронической формами, сходными в ряде случаев с малярией, чумой, пневмонией, милиарным туберкулезом или брюшным тифом [109; 125; 180; 191; 196]. Но главной особенностью этого заболевания является латентное пребывание микроорганизма в организме хозяина на протяжении многих лет после заражения, инкубационный период может длиться до 62 лет [135; 140]. Возможны рецидивы инфекции несмотря на соответствующую антибиотикотерапию и наличие высоких титров антител у инфицированного пациента [73; 129; 195]. В последнее время все чаще встречаются сообщения о внебольничной септицемии, в которых отмечают, что на ее долю приходится до 20% этих тяжелых форм заболевания. Для острой септицемической формы мелиоидоза, характерен высокий показатель летальности: от 80 до 95 % [126]. Смерть может наступить в течение 48 ч после начала заболевания [70; 73; 129; 178; 200].

Спорадические случаи мелиоидоза были зарегистрированы у домашних животных (собаки и кошки), у сельскохозяйственных животных (лошади, мулы и ослы, козы, овцы, крупный рогатый скот, буйволы). Описаны случаи заболеваний животных в зоопарке, таких как тюлени, дельфины, крокодилы [77; 182; 197]. Некоторые исследователи полагают, что дикие птицы также могут быть переносчиками возбудителя *B. pseudomallei*, но исследования, проведенные Hampton V. с соавторами, опровергли эту теорию [98].

До настоящего времени вопросы защиты от инфекции и эффективного лечения данного заболевания не теряют актуальности, исследования по разработке лицензированной вакцины (вакцин-кандидатов) продолжаются. Кроме того, даже после успешного лечения мелиоидоза устойчивый иммунитет не развивается, что было доказано Vietri N.J. с соавторами после выявления случая(ев) повторного заражения пациентов другим штаммом *B. pseudomallei* [197].

На сегодняшний день в качестве вакцины-кандидата были апробированы убитые целые микробные клетки, живые ослабленные клетки микроорганизма, разнообразные белковые субъединицы *B. pseudomallei*, капсульный полисахарид,

липополисахаридный антиген и экспериментальные вакцины на основе ДНК. Оценка протективности вакцинных препаратов производилась в тестах *in vivo* [171].

Многие из предложенных вакцинных препаратов обеспечивали только кратковременную защиту от острого мелиоидоза. Однако проблема состоит в долгосрочной защите и защите от хронических форм заболевания после вакцинации [171]. Поскольку *B. pseudomallei* является факультативным внутриклеточным патогеном, вполне вероятно, что оба иммунных ответа, клеточный и гуморальный, будут иметь решающее значение в разработке вакцинного препарата для долговременной защиты [110].

В опытах на животных было показано, что многие перспективные вакцины не защищали мышей от мелиоидоза спустя 30-40 суток после заражения [101; 139; 171], а в конце периода эксперимента из ткани вакцинированных выживших животных или в конце обсервационного периода выделяли микробные клетки *B. Pseudomallei* [170].

Исследования по разработке вакцины велись с цельными клетками *B. pseudomallei*, которые были убиты облучением или нагреванием [51; 170; 171]. Barnes J.L. с соавторами подкожно инъецировали мышам взвесь убитых нагреванием клеток *B. pseudomallei* с целью вызвать иммунный ответ, а затем внутривенно заражали животных *B. pseudomallei*. Большинство мышей погибло на 5 сутки после заражения. Результаты опыта свидетельствовали о неэффективности использования в качестве вакцины-кандидата убитых цельных клеток при внутривенном пути заражения [51]. Противопоставление этому исследованию, Sarkar-Tyson с соавторами показали, что внутрибрюшинная вакцинация целыми убитыми клетками *B. pseudomallei* обеспечивала защиту 60 % мышей в течение более чем 40 дней от последствий аэрогенного заражения небольшой инфицирующей дозой [170].

Липополисахарид и капсульный полисахарид также были изучены зарубежными авторами в качестве потенциальной субъединицы экспериментальной вакцины, проверенной на биопробных животных. Nelson M. с

соавторами внутрибрюшинно вакцинировали одной из этих двух субъединиц, после чего этим же методом заражали мышей. Авторы сделали выводы, что длительной защиты макроорганизма достичь не удалось [139].

Несмотря на многолетние исследования, направленные на создание экспериментальной вакцины, способной защитить человека от *B. pseudomallei*, значимых успехов не получено. Патогенез мелиоидоза все еще остается недостаточно изученным.

Патогенные буркхольдерии обладают арсеналом факторов вирулентности, которые позволяют уклоняться от иммунного ответа хозяина и сохраняться в естественных условиях. К ним отнесены: капсула, липополисахарид, жгутики, пили, QS, система секреции III типа, а также механизмы переключения морфотипа [48; 56; 68; 79; 80; 95; 99; 128; 145; 153; 166; 183; 185; 189]. Дополнительные бактериальные факторы до сих пор еще не описаны.

Полисахарид первоначально был выделен и охарактеризован как O-PS компонент ЛПС в *B. pseudomallei* и был назван I O-ПС [154]. Однако, Reckseidler-Zenteno доказали, что полисахарид I O-ПС не является фрагментом O-PS [163]. Гены, участвующие в кодировании этого полисахарида гомологичны генам, участвующие в кодировании капсульного полисахарида у многих микроорганизмов, включая *N.meningitidis*, *H.influenzae* и *E.coli*. Также было доказано, что гены, ассоциированные с образованием капсульного полисахарида не связаны с кластером генов, участвующих в образовании O-PS [80]. С помощью вестерн-блот-анализа и окрашивания серебром установлено, что I O-ПС полисахарид имеет высокую молекулярную массу (200 kDa) и не имеет специфичных белков как у фрагментов O-PS [62]. Независимо от исследования Reckseidler-Zenteno этот вывод был дополнительно подтвержден в работах Isshiki Y. с соавторами [112].

В свое время Holden M.T.G. с соавторами идентифицировали еще два кластера полисахаридов в штамме K96243 *B. pseudomallei*, названных в дальнейшем III O-PS и тип IV O-PS [108]. Но до конца эти полисахариды не охарактеризованы.

Как в зарубежных, так и в отечественных исследованиях была продемонстрирована роль капсулы в реализации вирулентности *B.pseudomallei* [32; 34; 161; 162]. Wikraiphat С. с соавторами доказали необходимость наличия капсулы для оптимального выживания и / или репликации микроорганизма в макрофагах макроорганизма [204], а также выживания микроорганизма в сыворотке за счет снижения С3b-опосредованной опсонизации и фагоцитоза [162; 167].

Ранее, Плеханова Н.Г. с соавторами в экспериментах по моделированию острого мелиоидоза у сирийских хомячков изучили продукцию капсульного гликопротеинового комплекса *B. pseudomallei* и доказали его роль в патогенезе инфекции, выявив корреляцию между вирулентностью *B. pseudomallei* и наличием капсульного полисахарида [33; 161].

Роль капсульного полисахарида в вирулентности подтверждается тем фактом, что кластер генов, отвечающий за синтез капсульного полисахарида, присутствует и в близкородственном вирулентном микроорганизме *B.mallei* [81], но отсутствует в *B.thailandensis*, непатогенной буркхольдерии, выделенной из внешней среды, но генетически тесно связанной с *B. pseudomallei* [58; 118; 142; 151; 210].

Буркхольдерия *B. thailandensis* – непатогенная почвенная бактерия, первоначально идентифицирована в Таиланде во второй половине 1990-х годов [57]. На основе биохимических, иммунологических и генетических данных установлено, что *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* являются близкородственными буркхольдериями. В то же время, эти два микроорганизма отличаются по 15 нуклеотидным последовательностям [58], что отражает существенные различия в геномах этих микроорганизмов [65].

В настоящее время определены генотипические и фенотипические признаки, по которым возможно отдифференцировать эти два микроорганизма друг от друга. Основными признаками являются способность *B. thailandensis* ассимилировать L-арабинозу и неспособность синтезировать капсулу [58; 80; 81; 161; 180].

Smith M.D. с соавторами, детально изучая сравнительные данные свойств почвенных изолятов *B. pseudomallei* и изолятов, выделенных от стационарных больных, доказали, что существует два биотипа микроорганизма, которые практически идентичны с точки зрения фенотипа и биохимического профиля. Основной отличительной чертой является разница в их способности усваивать L – арабинозу [180]. Почти все клинические изоляты *B. pseudomallei* не ассимилируют L- арабинозу (Ara⁻), в то время как изоляты, выделенные из почвы, могут принадлежать как Ara⁺, так и Ara⁻ биотипу. Данные по этим двум группам свидетельствовали о том, что Ara⁺ гораздо менее опасны, чем изолят Ara⁻ *B. pseudomallei*. В экспериментах на животных, было показано, что 50% летальная доза (LD50) для биотипа Ara⁺ была намного выше, чем для Ara⁻ биотипа [57; 180].

Полученные данные, подтверждали то, что Ara⁻ *B. pseudomallei* является вирулентным биотипом и отвечает за тяжесть клинической картины мелиоидоза. В то время как авирулентный изолят (Ara⁺) представляет интерес с точки зрения использования его в качестве одного из кандидатов в разработке экспериментальной вакцины [82].

Установлено, что *B. thailandensis* обладает рядом аналогичных факторов вирулентности, которые характерны для *B. pseudomallei*. К ним относятся: липополисахариды, связанные с системами III и VI типа секреции, а также QS [60; 100; 159; 173]. Кроме того, *B. thailandensis* способен выживать и реплицироваться в эукариотических клетках, полимеризуя актин внутри клетки-хозяина для облегчения внутри- и межклеточного распространения, а также стимулирует образование многоядерных гигантских клеток [54; 100; 102; 187]. В силу этих особенностей *B. thailandensis* считают универсальной модельной системой для изучения ряда конкретных механизмов, участвующих в патогенезе мелиоидоза [100].

В более ранних работах по изучению токсинов возбудителя мелиоидоза сообщалось, что некоторые регистрируемые проявления инфекции, обусловленной *B. pseudomallei*, были связаны с экзотоксинами этого

микроорганизма, хотя в последнее время подтверждающих доказательств этого очень мало [72; 97; 105; 138; 143]. Так Liu P.V. [130] показал, что *B. pseudomallei* секретирует смертельный и дермонекротический токсин. А работы Heckly R.J. и Nigg C. [105] доказали, что существуют две термолабильные субъединицы, которые при внутрибрюшинном введении в мышам вызывают гибель животных, но только один из этих токсинов обладает дермонекротической активностью. Позже Ismail G. с соавторами [111] сообщали о белке с м.м. 31 kDa, который являлся сильным ингибитором ДНК, а также оказывал ингибирующее действие на синтез белка в культивируемых макрофагах [138]. Для демонстрации данного эффекта требуется относительно высокая концентрация токсина, эквивалентная 50 мл бактериальной культуры. Маловероятно, что этот токсин играет роль в развитии септической формы мелиоидоза.

Тем не менее, некоторые ученые считают, что экзотоксины играют роль в быстром начале заболевания и отвечают за развитие септического мелиоидоза. Так Naase A. с соавторами обнаружили низкомолекулярный (3 kDa) токсин, способный вызывать цитопатогенный эффект на модели клеток McCoу. Этот белок был выделен из объектов окружающей среды [97]. Так, изоляты из почвы, оказывались менее токсичными, чем те, которые были выделены от больных мелиоидозом, у которых клиническая картина была похожа на симптоматики энцефалитных больных. Woods M.L. с соавторами [207] предположили, что «неврологический» мелиоидоз можно отнести к экзотоксин-опосредованной патологии при отсутствии вторичных инфекций центральной нервной системы [123]. Однако, Currie V. с соавторами сделали вывод, что это могло быть связано с прямым контактом с возбудителем [76].

Häußler S. с соавторами обнаружили другой экзотоксин с м.м. 762 Da, состоящий из двух молекул рамнозы и двух молекул β -гидрокситетрадекановой кислоты [104]. Этот токсин оказывал цитотоксическое действие на фагоцитарные (HL60) и не фагоцитарные (HeLa) клеточные линии, но при обработке экзотоксина альбумином его цитотоксические свойства были нейтрализованы. Вероятно, роль этого токсина в патогенезе *B. pseudomallei* малозначима [59].

До сих пор неясно, соответствует ли любой из этих токсинов тем вариантам, которые были описаны ранее Neckly R.J. с соавторами [105].

Роль экзотоксинов как факторов вирулентности *B.pseudomallei* в патогенезе инфекции является весьма спорной. Экзотоксины, вызывающие цитотоксическое действие в культуре клеток различного происхождения, не воспроизводили эти эффекты на модели *in vivo*, даже при использовании концентрированных лиофилизированных препаратов [57; 58; 206]. А последовательность генома не кодирует никаких гомологов известных крупных токсинов, вырабатываемых другими патогенными микроорганизмами [108].

Также к вирулентным факторам относят липополисахарид (ЛПС). ЛПС *B. pseudomallei* (официальное название тип II О-антигенный полисахарид) является основным константным биополимером наружной мембраны грамотрицательной бактерии. Клиника септического мелиоидоза имеет схожие черты с эндотоксемией. Вероятно, большую роль в патогенезе заболевания играет ЛПС *B. pseudomallei*, который участвует в иницировании сепсиса [55; 127]. В процессе репликации, лизиса и гибели клетки, ЛПС высвобождается из клеточной поверхности бактерий и вызывает широкий спектр патофизиологических изменений в макроорганизме [165]. При низких концентрациях ЛПС в организме хозяина способен активировать систему комплемента, макрофаги, В-лимфоциты [205], влиять на проявление в клинической картина симптомов лихорадки. В высоких концентрациях ЛПС способен вызвать шок или даже смерть макроорганизма [172].

ЛПС состоит из наружного О-антиген-специфического полисахарида и внутреннего ядра олигосахарида, который ковалентно связан с липофильным фрагментом, называемым липидом А.

Липид А является наиболее константной частью молекулы ЛПС всех видов грамотрицательных бактерий, но еще более постоянной частью в группе близкородственных видов [107; 155]. Miller S.I. с соавторами и Rietschel E.T. с соавторами подтвердили факты того, что липид А является токсичной частью молекулы ЛПС и в силу своего расположения в наружной мембране, он

оказывают свое действие только тогда, когда происходит лизис бактерии [137; 165].

Структура О-антигена представлена фенотипически и генетически разнообразной частью молекулы ЛПС [158]. О-антиген состоит из повторяющихся звеньев и его структура может варьировать в зависимости от штаммов *B. pseudomallei*. Различают четыре типа О-антигена, известные как А-, В-, В2- и R-колонии. Тип А наиболее распространенный серотип (89%), тогда как типы В и В2 (10%) менее распространены. R тип встречается значительно реже, чем остальные типы О-антигена (1%) [193]. Тип А встречается у *B. mallei*, *B. oklahomensis*, во всех штаммах *B. thailandensis* [141; 190], кроме штамма 82172, который содержит ЛПС со структурой О-антигена типа В2 [190].

Perry M.B. с соавторами сообщили о наличии двух вариантов ЛПС в *B. pseudomallei* [154], хотя более поздние исследования показали, что одним из О-ПС в составе ЛПС является капсульный полисахарид [112].

Тип III секретионная система (TTSS) тоже относят к факторам вирулентности *B. pseudomallei*. На сегодняшний день различают три различных локуса TTSS: (1) TTSS1, (2) TTSS2, и (3) TTSS3 [108; 122; 159], два из которых, локусы 1 и 2 типа TTSS похожи на TTSS генов растений возбудителя *Ralstonia solanacearum*. TTSS1 отсутствует в *B. mallei* и *B. thailandensis* [108; 159; 192]. Роль этих двух систем в патогенезе до конца не известна, но в экспериментах на животных показано, что на модели золотистых хомячков TTSS1 и TTSS2 не имеют значения для проявления вирулентности [122]. В то время как TTSS3 locus похож на TTSS у сальмонелл и шигелл [49; 120; 159; 188] и отвечают за вирулентность *B. pseudomallei* как в случае выбора в качестве экспериментальной модели золотистых хомячков, так и мышей [122; 184; 199]. Эффекторный белок, вырабатываемый TTSS3, облегчает проникновение микроорганизма в эпителиальные клетки хозяина и способствует уклонению от эндоцитотических вакуолей [120; 184; 188].

Таким образом, до сих пор неясно какие компоненты клетки *B. pseudomallei* оказывает наиболее выраженное цитотоксическое действие на клетки макроорганизма.

Экспериментальное моделирование цитотоксического состояния на модели перевиваемых клеточных линий может способствовать выявлению потенциально токсичных субстанций в различных биополимерах, изолируемые из микробной клетки. С другой стороны, подобный подход может явиться информативным методом оценки токсических свойств антигенных смесей, используемых на практике для иммунизации экспериментальных животных-доноров гипериммунных сывороток, а также при скрининге на токсичность разрабатываемых экспериментальных вакцинных препаратов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клеточные линии

Для изучения потенциально токсичных комплексных антигенов микробных клеток *B. pseudomallei* в качестве моделей использовали паспортизированные перевиваемые клеточные линии животных (L929 – фибробласты мыши и СНО-К1 – 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).

Клеточные линии второго типа – гибридомы-продуценты МКА к антигенам *B. pseudomallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Культуры клеток постоянно сохраняются при -196°C в биохранилище с жидким азотом ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в криоконсервированном состоянии [44].

2.2 Лабораторные животные

Экспериментальных животных получали из питомника ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. В работе были использованы инбредные белые мыши линии BALB/c массой 6-20 г. Их использовали для приготовления подкормочного (фидерного) слоя клеток, предназначенного для тиражирования *in vitro* гибридом-продуцентов МКА,

выведенных из криоконсервированного состояния, 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.

2.3 Питательные среды для культивирования клеток

Для культивирования перевиваемых клеточных линий в качестве основной среды использовали полусинтетическую питательную среду DMEM, производимую Федеральным государственным унитарным предприятием «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» (Россия).

Для масштабирования популяции клеток по мере необходимости готовили полную среду: основная среда DMEM плюс 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ф. NuClone, Германия), 2 mM глутамина, 4 mM пирувата натрия, пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, NEPES 5 mM, pH среды 7,1-7,2.

Пересев монослойных клеточных линий L929, CHO-K1, Hela ТК осуществляли 2 раза в неделю.

Коммерческие растворы, содержащие 0,25 % трипсина и 0,02 % версена использовали для снятия монослоя перевиваемых клеточных линий с поверхности пластика. Для отмывания монослойных клеточных линий от смеси трипсин-версен применяли среду 199 (вышеназванного производителя).

При подготовке культур к криоконсервированию готовили необходимое количество среды для замораживания клеточных линий: основная среда DMEM плюс 20 % ЭТС и 7 % ДМСО. Для криоконсервирования использовали ампулы для замораживания, в каждую из них вносили по 1,0 мл взвеси клеток с концентрацией $4,0 \cdot 10^6$ кл/мл.

2.4 Антигены, использованные в работе

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.

Обеззараженные ацетоном бактериальные клетки *B. pseudomallei* были предоставлены сотрудниками лаборатории для проведения этапов работы по получению водно-солевых и формамидных экстрактов из клеток бактерий.

Приготовление водно-солевого экстракта (ВСЭ). К 1 г сухой бакмассы обеззараженных ацетоном клеток возбудителя мелиоидоза 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 [30].

Разрушенные фрагменты клеток отделяли центрифугированием при 16000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую смесь растворимых антигенов *B. pseudomallei*, отделяли и определяли в этом образце ВСЭ содержание белка и полисахаридов. Затем образец антигена ампулировали по 0,5 мл и хранили при -20°C .

Гликопротеин капсулы B. pseudomallei был получен методом формамидной экстракции полисахаридов бактерий из *B. pseudomallei* 100 в модификации [90].

Все образцы антигенов до начала основных опытов были проверены потенциометрически для определения pH и приведены к значению данного

показателя к $7,0 \pm 0,1$. С помощью мембранных фильтров с величиной пор $0,22$ мкм образцы антигенов были простерилизованы во избежание возможного заноса в лунки культуральных пластин посторонней микрофлоры из внешней среды.

2.5 Методы биохимического анализа антигенов

Во всех образцах антигенов определяли содержание белка и полисахаридов по методу Лоури и Дюбо соответственно [84; 131].

2.6 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, CO_2 -инкубатором, деионизатором воды, низкоскоростной центрифугой, малым биохранилищем культур, комплексом аппаратов для криоконсервирования культур клеток х [43].

2.7 Размораживание клеточных линий

Ампулы с криоконсервированной культурой клеток L929, CHO-K1, Hela TK или Hela M извлекали из биохранилища и быстро помещали в теплую водяную баню (37°C). Размораживание осуществляли в течение 2-3 мин, до полного растворения содержимого ампулы. Содержимое ампулы с помощью пастеровской пипетки переносили в центрифужную пробирку со средой 199 и взвесь клеток медленно наслаивали на поверхность среды. Затем взвесь клеток центрифугировали при 800 об/мин в течение 7-10 мин, надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в 1 мл полной среды DMEM и переносили в 6-луночные пластины для дальнейшего масштабирования популяции клеток.

Для оценки жизнеспособности клеток после их размораживания использовали тест на исключение красителя [5]. В пробирку с 0,1 мл суспензии клеток добавляли равный объем 0,4 % раствора трипанового синего и на гемоцитометре (камера Горяева) подсчитывали относительное количество живых (не окрашены) и мертвых (окрашены в темно-синий цвет) клеток. Затем рассчитывали относительный показатель числа жизнеспособных клеток (%).

2.8 Условия культивирования клеточных линий

Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5-7 % CO₂ и влажности 70-80 %. Интенсивность роста популяции клеток контролировали при просмотре лунок пластин в инвертированном микроскопе. Пересевы и смену среды делали каждые 3-4 сут, кратность посева 1:4 – 1:8.

Основную часть взвеси размороженных клеток разносили по лункам культуральных пластин. Для культивирования клеток использовали пластиковую посуду различного формата для работы с клеточными культурами (Multiple well plates, фирмы Costar).

На этапах тиражирования клеточных популяций посевная доза и рабочий объем в лунках с растущими культурами соответствовали рекомендациям фирмы-производителя пластиковой посуды.

Контроль состояния клеточных культур производили ежедневно, просматривая высевы с помощью инвертированного микроскопа при различном увеличении объекта (40^x, 100^x, 200^x, 320^x) 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.

2.9 Методика снятия монослоя клеток с поверхности пластика

При подготовке клеточных линий к опытам по оценке цитотоксичности различных антигенов возбудителя мелиоидоза проводили этап масштабирования клеточной популяции в 6-луночных пластинах с последующей трипсинизацией для монослойных перевиваемых клеточных линий.

Производили высеv клеток в 6-луночные пластины с оптимальной плотностью $1,0-2,0 \cdot 10^4$ кл/см² для СНО-К1, $1,0-5,0 \cdot 10^4$ кл/см² для фибробластов мыши L929, $1,0-5,0 \cdot 10^4$ кл/см² для Hela ТК и $3,0-9,0 \cdot 10^5$ кл/мл для Hela S3. Через 2-3 сут проводили трипсинизацию культур.

Готовили рабочие растворы трипсина с версеном: для овариальных клеток китайского хомячка соотношение объемов трипсин : версен составляло 1 : 1, для линии мышинных фибробластов L929 и для эпителиоидной карциномы шейки матки человек Hela ТК - 1 : 3 [27].

С поверхности монослоя клеток удаляли среду выращивания и наносили первую порцию смеси трипсин : версен в объеме 3-5 мл. Контакт клеток с раствором длился 3-5 мин при легком покачивании пластин, после чего жидкость удаляли и вносили на поверхность клеток вторую порцию смеси трипсин : версен (по 2 мл/лунку). Клетки начинали округляться и через 3-5 мин полностью откреплялись от поверхности пластика.

Согласно паспортным данным, кратность последующего засева клеток линии L929 и Hela ТК составляла 1 : 3, а затем в соотношении 1 : 5. Для линии клеток яичника китайского хомячка эти показатели были равны 1 : 4 – 1 : 15 [22]. Для суспензионной клеточной линии Hela S3 оптимальная плотность составляет $3,0-9,0 \cdot 10^5$ кл/мл.

Для постановки основного опыта готовили взвесь клеток свежей трипсинизированной культуры с такой концентрацией, которая была необходима для внесения в лунки определенного формата.

В лунки пластин вносили взвесь клеток с концентрацией и объемом, равными расчетным величинам для пластин определенного формата. Антигены вносили

сразу после высева перевиваемых клеточных линий или через сутки после формирования монослоя. Обязательным условием являлось наличие не менее двух контрольных лунок с интактной культурой клеток на каждой опытной пластине. Пластины инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C и насыщении атмосферы 6-7 % CO_2 в течение 4 суток. Учет результатов опытов производили ежедневно [25].

В течение срока наблюдения регистрировали происходящие морфологические изменения клеток от воздействия различных антигенов. День постановки опыта считали нулевым. Продолжительность эксперимента – число полных суток с момента постановки опыта. Учет реакции клеток на токсическое воздействие антигенов проводили, сравнивая морфологию опытных и контрольных клеток с помощью инвертированного микроскопа. За цитотоксическую дозу принимали минимальное количество антигена возбудителя мелиоидоза, вызывающее морфологические изменения 50% клеток в лунке. Регистрировали следующие изменения: появление свободного пространства между клетками (зоны лизиса), изменение формы клеток (увеличение, удлинение или округление), изменения в состоянии клеточной стенки и прозрачности цитоплазмы, наличие включений, а также потерю клетками адгезивности.

2.10 Условия хранения клеточных культур

Клетки линий L929, CHO-K1, Hela TM и Hela S3 сохраняли в состоянии постоянно перевиваемых культур на полной среде DMEM. В периоды длительных перерывов между экспериментами избыточное количество клеток переводили в криоконсервированное состояние.

Для этого собранные клетки отмывали от среды их выращивания, центрифугируя взвесь при 800 об/мин. Надосадочную жидкость сбрасывали и осадок суспендировали в защитной среде для замораживания клеточных культур таким образом, чтобы концентрация клеток была $2,0-4,0 \cdot 10^6$ кл/мл. Приготовленную взвесь разливали по 1 мл в пластиковые ампулы для

криоконсервирования, маркировали их и помещали в аппарат для программируемого замораживания в режиме понижения температуры 1°C в минуту до -30°C , затем 5°C в минуту до -70°C .

Гибридомы-продуценты МКА, использованные в работе, разносили по $4,0 \cdot 10^6$ клеток в объеме 1 мл в каждую ампулу и замораживали в криозащитной среде, состоящей из 20% среды RPMI-1640, 7 % ДМСО. Режим заморозки гибридом-продуцентов МКА выполняли в том же режиме, что и перевиваемые клеточные линии.

Замороженные таким образом клетки помещали в биохранилище с жидким азотом (-196°C) [44].

2.11 Гибридомы-продуценты МКА, использованные в работе

В тесте нейтрализации токсического воздействия антигенов *B. pseudomallei* на клетки перевиваемых линий были использованы восемь образцов мышинных МКА различной эпитопной направленности против антигенов *B. pseudomallei* (Аг 8, Аг 6 и Аг 200 kDa): Ррm I, Ррm II, 2А₆, 2Н₇, 2F₁₁, 3С₆, 6А₁₁, 6Е₇. Продукентами этих МКА являлись гибридомы из коллекции лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии.

Для культивирования гибридом-продуцентов МКА *in vitro* в качестве основной питательной среды использовали RPMI-1640, производимую Федеральным государственным унитарным предприятием «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» (Россия). Для приготовления полной среды RPMI-1640 в нее дополнительно вносили стерильные растворы 15% ЭТС (ф. NuClone, Германия) или 10% ЭТС (для приготовления фидерных клеток), пирувата натрия 4 mM, пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, тилозин – 10 мкг/мл, глутамина 2 mM, HEPES 5 mM.

За сутки до размораживания гибридом-продуцентов МКА готовили слой подкормочных (фидерных) клеток. В качестве фидера использовали макрофаги перитонеального смыва с брюшной полости мышей линии BALB/c.

По мере роста и тиражирования клеток гибридом-продуцентов МКА производили пересев клеток в лунки больших объемов. Смену среды в культуральных пластинах производили через 3-4 сут. Через неделю после размораживания выполняли этапы проверки сохранности функции антителопродукции гибридом-продуцентов МКА с помощью ТИФМ.

Для получения асцитной жидкости (для накопление МКА в препаративных количествах) вводили $5,0 \cdot 10^6$ гибридных клеток в брюшную полость мышей BALB/c, предварительно получавших пристан (в/бр 0,5 мл) за 5-7сут до внутрибрюшинной инъекции гибридных клеток. Накопление асцитной жидкости регистрировали через 10-30 дней. При образовании асцитной жидкости ее извлекали и центрифугировали для осаждения клеточных элементов.

2.12 Очистка МКА, их характеристика, условия хранения экспериментальных образцов

МКА из культурального супернатанта и асцитной жидкости мышей получали методом одно- или трёхкратного переосаждения белка сульфатом аммония при 50 % его насыщения [146]. Осадок иммуноглобулинов отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин, разводили в дистиллированной воде и диализовали против 0,15 М NaCl. Образцы испытуемых МКА были охарактеризованы по показателям концентрации белка, специфической активности в ТИФМ и МФА. Гомогенность препаратов МКА проверяли в РИД с антивидовой сывороткой. Все испытуемые образцы МКА стерилизовали методом мембранной фильтрации с использованием фильтров с величиной пор 0,45 μ (Corning, Германия), ампулировали, сохраняли при -20 °C. Концентрацию белка в растворе МКА определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм [121; 175].

2.13 Методы регистрации и обработки результатов опытов

Фотографирование клеток перевиваемых линий проводили с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Для этого лунки с интактной культурой (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию антигена возбудителя мелиоидоза (опыт) фиксировали на предметном столике. Затем клетки фотографировали через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз. Во всех случаях данные объекты фотографировали без дополнительного окрашивания.

При обработке результатов опытов использовали компьютерные программы «Statistica 6.0», «Microsoft Office Excel 2003», «FastStone Image Viewer», «StatPlus 2009» с определением средних величин и доверительных интервалов для уровня достоверности 95 % по Фишеру-Стьюденту, а также традиционные методы вариационной статистики [1].

ГЛАВА 3 ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОДГОТОВКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРНЫХ КУЛЬТУР В ТЕСТАХ МИКРОЦИТОТОКСИЧНОСТИ

3.1 Изучение условий культивирования перевиваемых клеточных линий, использованных в работе

До начала основных экспериментов по изучению цитотоксических свойств антигенов возбудителя мелиоидоза были выполнены последовательные этапы выведения клеточных культур мышинных фибробластов L929, овариальных клеток китайского хомячка CHO-K1 и клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека сублиний HeLa (HeLa TK и HeLa S3) из криоконсервированного состояния. После размораживания клеточных культур *ex tempore* производили оценку жизнеспособности клеток этих популяций с помощью теста на исключение витального красителя трипанового синего на нулевом пассаже. Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в вышеназванных культурах, были равны 98%, 90%, 99% и 96% соответственно.

Затем производили высеv свежеразмороженных культур клеток в 6-луночные пластины в полную питательную среду DMEM с 10% ЭТС. Необходимо было установить сроки восстановления всех функций клеточной популяции на уровне паспортных данных и пролиферативных показателей в полном объеме при условии обязательного пересева клеток каждые 3-4 дня со сменой среды выращивания.

В течение всего этого времени культивирования популяций ежедневно осуществляли визуальный контроль за состоянием перевиваемых клеточных линий, оценивая темпы распластывания клеток на поверхности пластика монослойных культур (L929, CHO-K1 и HeLa TK), их морфологию (форму

клетки, прозрачность цитоплазмы, отсутствие в ней включений, очерченность клеточной стенки, отсутствие клеточного детрита на дне лунки) и функциональное состояние в части их адгезивности в отношении пластика.

Установлено, что через две недели индикаторные культуры полностью адаптируются к выбранным условиям, восстанавливают пролиферативную активность и активно размножаются, что позволяет проводить масштабирование популяций в объемах, необходимых для выполнения дальнейших экспериментов.

На рисунке 1 представлена типичная морфология интактных клеток в монослойной и полусуспензионной культурах линий L929, CHO-K1, HeLa ТК и HeLa S3.

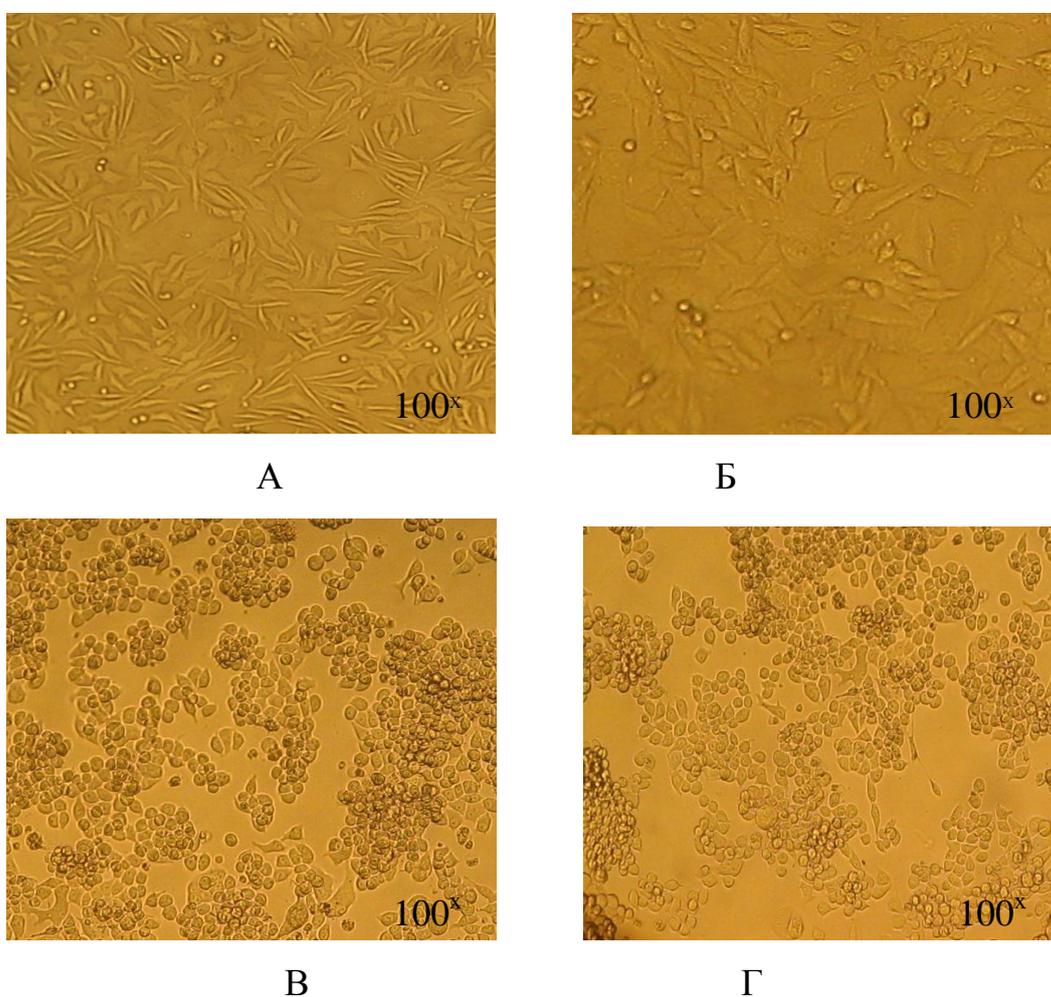


Рисунок 1 – Морфология интактных клеточных линий А – мышинных фибробластов L929; Б – клеток яичника китайского хомячка CHO-K1; В и Г – клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека сублинии HeLa (HeLa ТК и HeLa S3 соответственно).

L929 – монослойная клеточная линия, представленная веретенообразными удлинёнными клетками, плотно прилегающими друг к другу, с четко очерченной клеточной стенкой и незначительным количеством округлых неприкрепившихся к пластику клеток над монослоем.

СНО-К1 – монослойная клеточная линия с овально-веретенообразными клетками с более тонкой очерченностью клеточной стенки.

HeLa ТК – монослойная клеточная линия представлена округлыми клетками прикрепленными ко дну пластика.

HeLa S3 – полусуспензионная клеточная линия, представляет собой округлые клетки с четко очерченной клеточной стенкой с незначительным количеством клеток, прикрепленных ко дну пластика.

3.2 Подбор посевной дозы клеток в лунки пластин различного формата для монослойных культур клеток-мишеней линий L929 и СНО-К1

На этапе работы с интактными культурами клеток была изучена не только их типичная морфология, но и проведена оценка функционального состояния популяций.

В течение этого времени подбирали посевное количество клеток в определенном объеме среды в каждую лунку пластин различного формата для каждой популяции индикаторных культур. Для клеточных линий животных (мышинных фибробластов L929 и овариальных клеток китайского хомячка СНО-К1) основным условием для подбора оптимальной концентрации клеток в каждую лунку являлось образование плотного монослоя в течение суток. Следует отметить, что для перевиваемых клеточных линий с известными свойствами, адаптированных к конкретным условиям, монослой формируется приблизительно равной плотности.

Использование плотного монослоя клеточных культур обеспечивает объективную оценку изменения морфологии клеток на всех участках дна просматриваемой лунки. При формировании в лунке неполного участка монослоя

невозможно объективно оценить влияние испытуемого вещества на клетки-мишени, так как наличие свободных участков пластика в лунках, в которых на момент начала опыта был правильно сформирован монослой, а в последующем постепенно появлялись свободные от клеток зоны, является следствием цитотоксического воздействия на клетки-мишени.

Все опыты, проводившиеся с перевиваемыми клеточными линиями, были выполнены в 6-кратной повторности. При изучении динамики роста перевиваемых клеточных линий L929, СНО-К1 использовали 12-ти луночные пластины. Свеже трипсинизированные культуры переносили по $3,2 \cdot 10^5$ клеток в каждую лунку в объеме 1 мл среды DMEM (данные, рекомендуемые фирмой-изготовителем культуральных пластин). Через сутки после просмотра пластины проводили трипсинизацию культур для снятия с пластика всего сформировавшегося монослоя. Затем производили подсчет жизнеспособных клеток в каждой из проб. Процедуру повторяли в последующие сроки наблюдения. Условия эксперимента описаны выше в главе 2. Результаты данного опыта представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Абсолютные значения показателей динамики прироста клеточных популяций линий L929 и СНО-К1

Клетки-мишени		Сроки просмотра пластин (сутки)			
		1	2	3	4
L929	концентрация клеток в лунке ($\cdot 10^5$)	4,68±0,11	5,05±0,17	5,35±0,2	5,57±0,2
СНО-К1	концентрация клеток в лунке ($\cdot 10^5$)	4,05±0,23	4,63±0,19	5,13±0,28	5,3±0,23
посевная концентрация в 0 день – $3,2 \cdot 10^5$ клеток в лунке; размер выборки n=6.					

Данные, представленные на рисунке 2, свидетельствуют о положительной динамике прироста клеточных популяций L929 и СНО-К1 в течение всего срока

наблюдения. Признаков значимого истощения среды не выявлено. Поэтому в последующих экспериментах срок наблюдения составлял не менее трех суток.

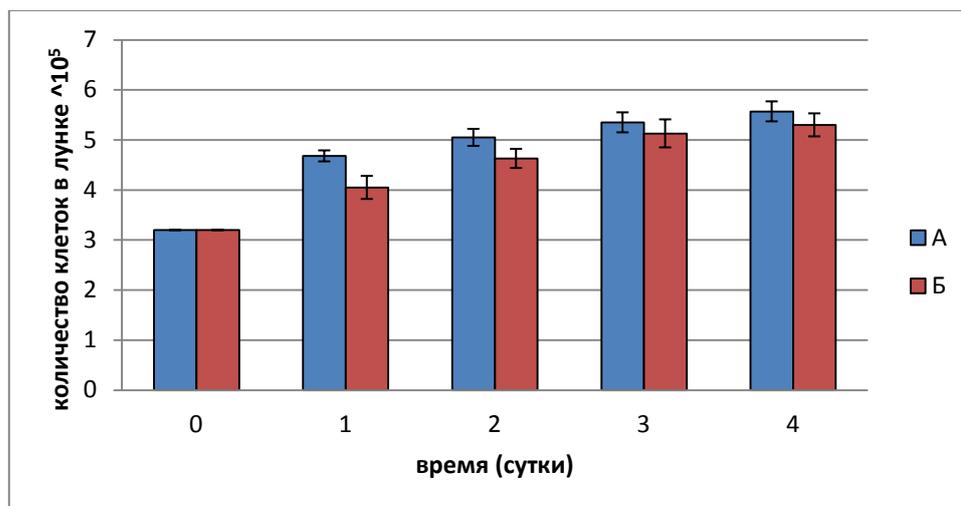


Рисунок 2 – Динамика нарастания численности клеток линий А – L929 и Б – CHO-K1 в течение всего срока эксперимента.

Использованные в работе клеточные линии обеспечивали хорошую воспроизводимость результатов опытов. Клетки мышинных фибробластов L929 и овариальные клетки китайского хомячка CHO-K1 в связи с их однородной морфологией и монослойным характером роста являются удобной моделью для скрининга различных антигенов возбудителя мелиоидоза, а также для применения в экспериментах по защите клеток-мишеней от токсического воздействия различных антигенов с помощью МКА разной эпитопной направленности против возбудителя мелиоидоза.

3.3 Подбор посевной дозы клеток-мишеней человека HeLa S3 и HeLa ТК в лунки пластин различного формата

Для малигнизированных клеточных линий (эпителиоидной карциномы шейки матки человека, сублинии HeLa (HeLa S3 и HeLa ТК)) – подбирали такую посевную дозировку клеток в каждую лунку, которая при более быстрой динамике их размножения не приводила к ускоренному истощению культуральной среды.

При работе с этими линиями клеток необходимо помнить о том, что вследствие своей агрессивности и жизнеспособности культуры сублинии HeLa могут являться контаминантом более 20% других клеточных линий, поэтому при работе с ними необходимо полностью исключить возможность контакта культуры HeLa с другими культурами клеток [21].

В таблице 2 представлены данные о динамике увеличения популяции индикаторных культур HeLa S3 и HeLa ТК в зависимости от выбора стартовой посевной дозы в 12-луночной пластины в объеме 1мл среды.

Таблица 2 – Абсолютные значения показателей динамики роста клеточных популяций линий HeLa S3 и HeLa ТК

Клетки-мишени			Сроки просмотра пластин (сутки)			
			1	2	3	4
HeLa S3	концентрация клеток в лунке ($\cdot 10^5$)	А	5,78±0,14	12,08±0,28	12,2±0,23	12,6±0,24
		Б	2,5±0,21	6,4±0,23	10,2±0,2	11±0,17
HeLa ТК	концентрация клеток в лунке ($\cdot 10^5$)	А	6,4±0,34	8,0±0,23	9,03±0,25	9,13±0,17
		Б	2,92±0,22	6,7±0,27	8,25±0,17	9,03±0,14
посевная концентрация в 0 день А – $3,2 \cdot 10^5$ клеток в лунке, Б – $2,0 \cdot 10^5$ клеток в лунке; размер выборки n=6.						

Как видно на рисунках 3 и 4 удвоение популяций клеточных линий HeLa S3 и HeLa ТК с концентрацией клеток $3,2 \cdot 10^5$ в лунке происходило в первые и вторые сутки до начала стационарной фазы (третьи и четвертые сутки с момента посева клеточных линий). Такая динамика нарастания клеток свидетельствовала о том, что популяция малигнизированных клеток достигала максимальных показателей пролиферативной активности в течение двух первых суток с момента постановки эксперимента. В то же время, выход в стационарную фазу является показателем того, что среда постепенно истощается, замедляются темпы удвоения популяции, продолжительность лаг-фазы увеличивается. Начало стационарной фазы роста наступало через трое суток.

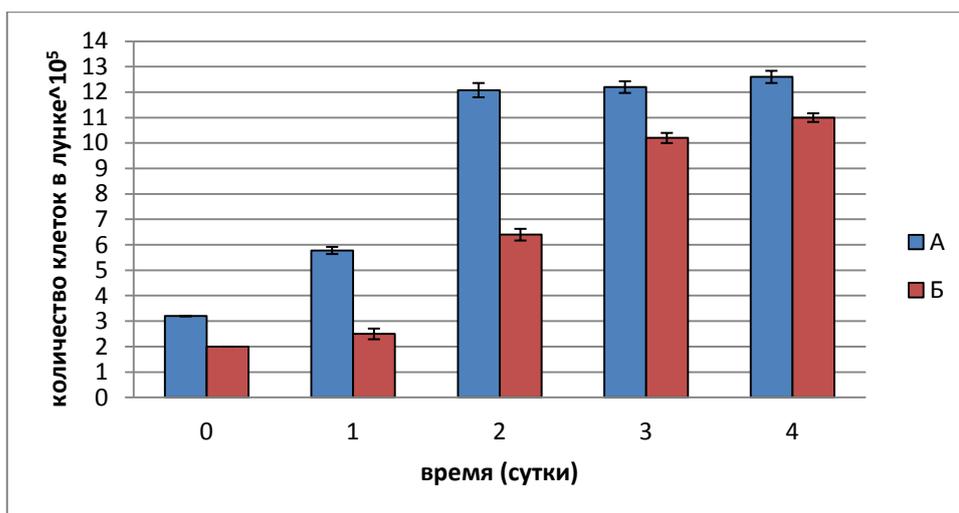


Рисунок 3 – Динамика нарастания численности клеток линии HeLa S3 в зависимости от выбора стартовой посевной дозы А – $3,2 \cdot 10^5$ клеток в лунке; Б – $2,0 \cdot 10^5$ клеток в лунке.

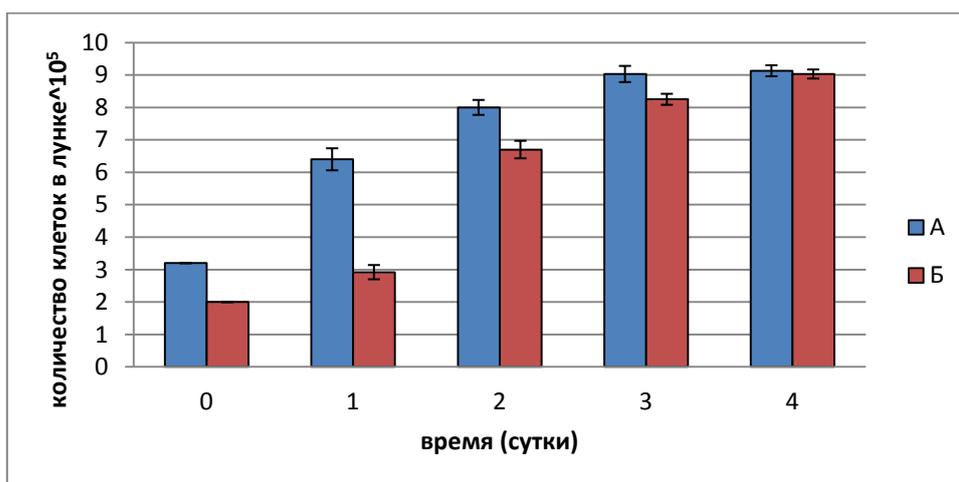


Рисунок 4 – Динамика нарастания численности клеток линии HeLa TK в зависимости от выбора стартовой посевной дозы А – $3,2 \cdot 10^5$ клеток в лунке; Б – $2,0 \cdot 10^5$ клеток в лунке.

Выбор в качестве индикаторных моделей клеток двух сублиний человеческой эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa TK и HeLa S3 с монослойным и полусуспензионным характером роста для скрининга антигенов возбудителя мелиоидоза в микроварианте теста микроцитотоксичности обусловлен областью их применения. Использование в качестве клеток-мишеней этих двух линий исключило ряд трудоемких манипуляций, в частности снятие

популяции клеток с поверхности пластика без применения раствора трипсина-версена, что уменьшает погрешность в показателях числа клеток, а также исключает воздействие фермента и детергента на клетки-мишени.

В таблице 3 приведены суммарные данные, касающиеся оптимальных посевных концентраций клеток перевиваемых линий животных (L929, CHO-K1) и человека (HeLa S3 и HeLa TK) при работе с пластинами различного формата фирмы Costar. За основу были взяты рекомендации фирмы-изготовителя пластика для культивирования клеточных линий. Вследствие того, что исследования были проведены с конкретными линиями клеток и средами отечественного производства необходимо было уточнить показатели посевной дозы клеток-мишеней индикаторных культур в лунки пластин различного формата.

Таблица 3 – Посевные дозировки индикаторных клеточных линий для пластин различного формата фирмы Costar

Пластины различного формата		Индикаторные клеточные линии			
		L929	CHO-K1	HeLa S3	HeLa TK
96-луночная пластина	Посевная дозировка в лунке (общее число клеток)	$0,2 \cdot 10^5$	$0,2 \cdot 10^5$	$0,1 \cdot 10^5$	$0,1 \cdot 10^5$
	Объем вносимой суспензии в лунку (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1
48-луночная пластина	Посевная дозировка в лунке (общее число клеток)	$0,6 \cdot 10^5$	$0,6 \cdot 10^5$	$0,5 \cdot 10^5$	$0,5 \cdot 10^5$
	Объем вносимой суспензии в лунку (мл)	0,25	0,25	0,25	0,25
24-луночная пластина	Посевная дозировка в лунке (общее число клеток)	$1,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$
	Объем вносимой суспензии в лунку (мл)	0,5	0,5	0,5	0,5
12-луночная пластина	Посевная дозировка в лунке (общее число клеток)	$3,2 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$
	Объем вносимой суспензии в лунку (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0
6-луночная пластина	Посевная дозировка в лунке (общее число клеток)	$8,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
	Объем вносимой суспензии в лунку (мл)	2,5	2,5	2,5	2,5

Таким образом, до начала основных экспериментов с использованием перевиваемых клеточных линий необходимо выполнить последовательно этапы выведения клеточных культур из криоконсервированного состояния, проверить жизнеспособность индикаторных культур, адаптировать клеточные линии к конкретным условиям эксперимента, изучить их свойства и пролиферативную активность, а также подобрать посевную дозу в лунку пластин различного формата для каждой популяции клеток.

ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ *B. PSEUDOMALLEI*

Для изучения цитотоксического воздействия биополимеров на клетки коллекционных перевиваемых культур L929, CHO-K1, HeLa S3 и HeLa ТК были использованы сложные по составу смеси антигенов: ВСЭ из обеззараженных ацетоном 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, который, по данным ряда авторов, является своеобразным маркером вирулентных штаммов *B. pseudomallei* [47; 179; 186]. Опыты выполняли на популяциях индикаторных линий, выращенных в полной среде DMEM с 10% ЭТС в культуральных пластинах одной и той же серии.

Химический состав антигенов *B. pseudomallei* представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Химический состав антигенов *B. pseudomallei*, использованных в работе

№№	Антигены	Белки* (мг/мл)	Углеводы** (мг/мл)
1	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 100	34,9	2,81
2	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 57576	20,1	2,4
3	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 56770	24,8	2,91
4	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 51274	19,9	2,28
5	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 59361	23,7	2,33
6	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 110	19,0	2,04
7	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 60913	43,0	4,7
8	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 56738	38,5	3,34
9	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер 5	1,6	0,25
10	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер 7	41,5	0,29
11	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер 16	11,2	1,7
12	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер 19	12,2	2,01
13	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер 22	6,9	1,05
14	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер 23	3,4	1,78
15	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер 24	4,5	0,27

* – Белки определены по методу Лоури; ** углеводы – по методу Дюбо;
ВСЭ – водно-солевой экстракт; ФЭ – формамидный экстракт

Непосредственно перед постановкой основных экспериментов по изучению токсических свойств вышеназванных антигенов были выполнены этапы их подготовки, изложенные в главе 2.

4.1 Определение цитотоксичности и цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза на перевиваемых клеточных линиях L929, CHO-K1, HeLa ТК, HeLa S3

При изучении потенциально токсического воздействия антигенов возбудителя мелиоидоза в тесте микроцитотоксичности использовали методики прямого контакта испытуемых антигенов с клетками-мишенями. При учете результатов применяли качественные и количественные показатели (в зависимости от целевой установки конкретного опыта). Критериями токсического воздействия являлись: морфологические изменения клеток, снижение темпов роста и размножения, гибель клеток.

Микроскопические изменения клеток-мишеней оценивали *ad oculum* в инвертированном микроскопе по морфологическим и деструктивным изменениям в виде:

- 1) изменения формы клетки в виде набухания, округления или утончения;
- 2) изменения цитоплазмы в виде вакуолизации, зернистости;
- 3) лизис ядра, образования нескольких ядрышек;
- 4) полное разрушение клетки или ее пикноз (сморщивание).

Согласно рекомендациям при проверке токсических свойств анализируемых веществ целесообразно использовать в работе по две дублирующие линии клеток (например, клеточные линии животных L929 и CHO-K1 и человека HeLa S3 и HeLa ТК) [43].

Цитотоксическое действие антигенов на модели клеток-мишеней рассматривают как завершающий акт сложного и многоступенчатого процесса их деструкции, который можно обнаружить морфологически [38; 43]. Для острого

ЦТД характерна массовая гибель клеток-мишеней (50% и более по сравнению с контролем) при прямом контакте с одним из вариантов антигенов возбудителя мелиоидоза. В ряде случаев ЦТД можно зарегистрировать через сутки после внесения антигена. Цитопатогенный эффект проявлялся в виде гибели менее 50 % клеток индикаторных культур по сравнению с контролем. При минимальном цитопатогенном потенциале антигенной фракции изменения, происходящие в монослое незначительны и касаются прежде всего формы клеток.

4.2 Множественный скрининг антигенов возбудителя мелиоидоза в микроварианте теста цитотоксичности на популяциях перевиваемых клеточных линий L929 и СНО-К1

Для постановки экспериментов использовали свежие трипсинизированные индикаторные культуры линий L929 и СНО-К1. Опыты с каждой из этих линий выполняли в одно и то же время, что в значительной степени облегчало проведение сравнительного анализа получаемых результатов.

В лунки 24-луночных пластин для культивирования популяции вносили по $1,6 \cdot 10^5$ клеток L929 и СНО-К1 в каждую лунку 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 в каждую лунку, (день внесения антигена в лунки с монослойной культурой считали 0 днем). В качестве контроля на каждой пластине присутствовали лунки с интактной культурой.

В течение трех дней эксперимента ежедневно производили качественную и количественную оценку результатов опытов, оценивая морфологию и функциональное состояние клеток-мишеней. Просмотр пластины всегда начинали с контроля.

4.2.1 Изучение динамики гибели клеток-мишеней L929 и СНО-К1 при контакте с водно-солевыми экстрактами возбудителя мелиоидоза в тесте микроцитотоксичности

В опытные лунки 24-л пластины вносили культуру клеток L929 и СНО-К1. После образования монослоя добавляли образцы ВСЭ *B.pseudomallei* штаммы 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738 в дозировке 40 мкл в каждую лунку. Условия проведения опытов полностью соответствуют, описанным в главе 2.

В течение всего срока эксперимента наблюдали морфологические изменения в популяции индикаторных культур. При этом была отмечена зависимость морфологических изменений клеток от срока контакта с антигенами.

На рисунках 5 и 6 приведены относительные показатели жизнеспособности индикаторных культур L929 и СНО-К1 при прямом контакте с ВСЭ *B.pseudomallei*. Как следует из этих данных, комплексные антигены (ВСЭ) *B.pseudomallei* проявили различную степень цитотоксичности и цитопатогенности в отношении клеточных линий L929 и СНО-К1. Отличия в снижении жизнеспособности L929 и СНО-К1 по сравнению с контролем были статистически значимыми ($p < 0,05$).

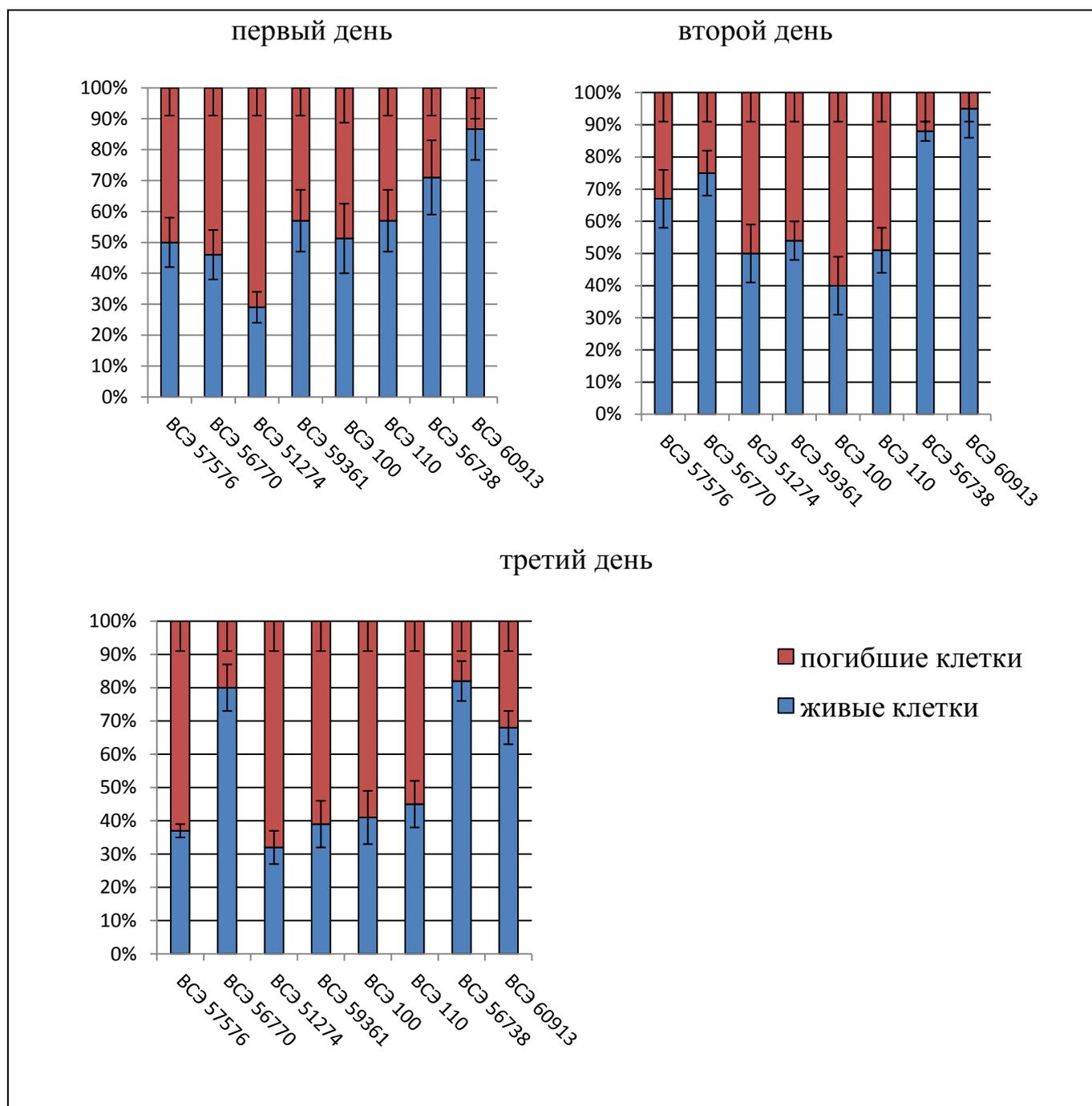


Рисунок 5 – Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослое клеточной культуры L929 при контакте с BCЭ в течение всего срока эксперимента.

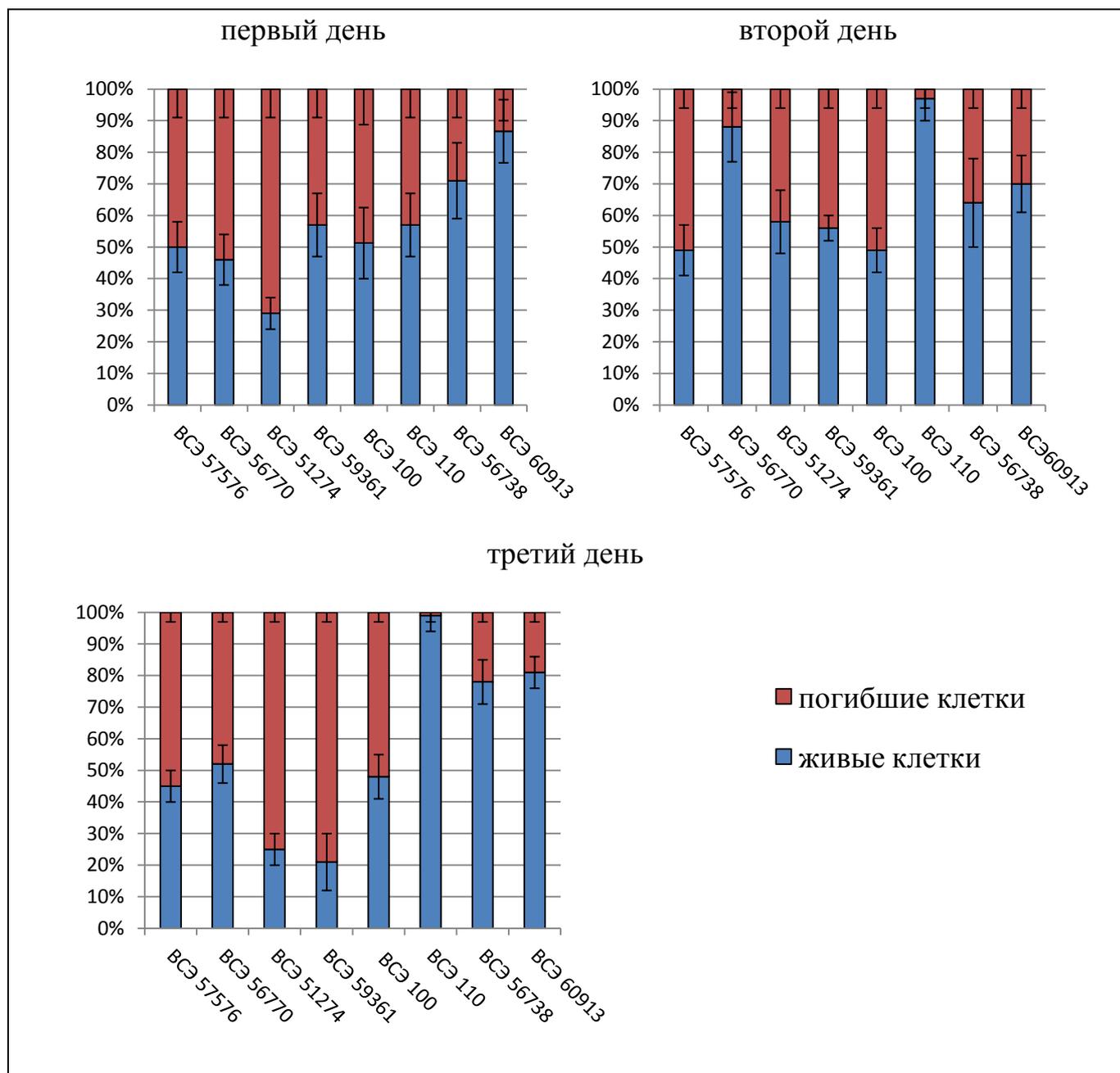


Рисунок 6 – Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослое клеточной культуры CHO-K1 при контакте с ВСЭ в течение всего срока эксперимента.

Скрининг ВСЭ антигенов возбудителя мелиоидоза показал, что образцы ВСЭ *B.pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361 в объеме 40 мкл в каждую лунку, что соответствует концентрации белка в диапазоне 0,8-1,4 и концентрации

углеводов 0,09-0,11, оказали максимально выраженный цитотоксический эффект при контакте с индикаторными культурами. Объективные данные по нарастанию проявлений цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза штаммов 100, 57576, 51274, 59361 в отношении клеток-мишеней L929 и СНО-К1 представлены на рисунках 7-14.

Таким образом, установлено, что чувствительность двух апробированных клеточных линий в отношении восьми вариантов ВСЭ *B. pseudomallei* колебались в диапазоне от резко выраженного токсического воздействия до минимальных цитопатогенных изменений на клетках-мишенях. Выраженной токсичностью на индикаторные культуры обладали образцы ВСЭ *B. pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361. 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, видимые при увеличении 100^x.

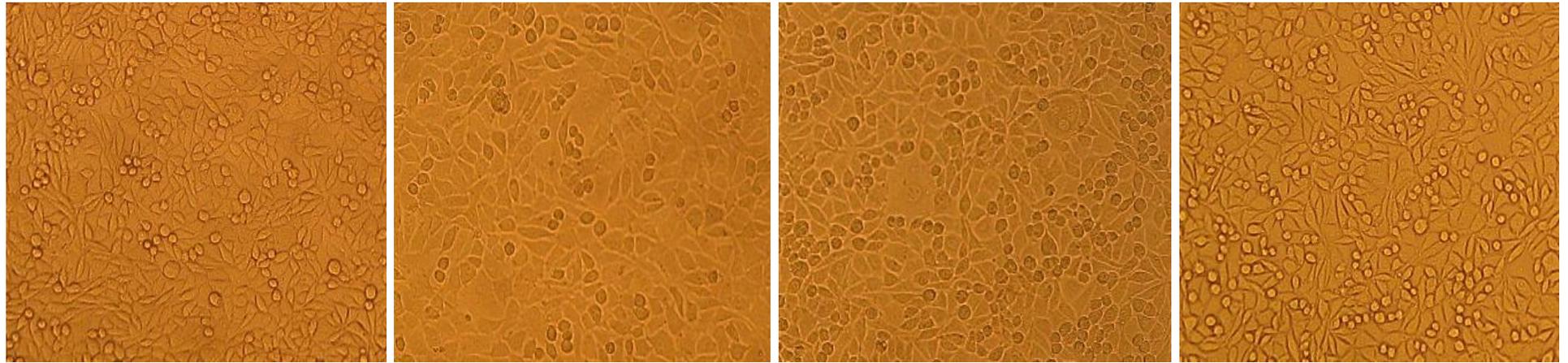
Сравнительное исследование эффектов цитотоксичности и цитопатогенности в отношении индикаторных линий выявило, что клетки линии СНО-К1 обладали более высокой чувствительностью в отношении антигенов возбудителя мелиоидоза.

4.2.2 Изучение динамики гибели клеток-мишеней L929 и СНО-К1 при контакте с образцами формамидных экстрактов (ФЭ) гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100

Опыты по определению качественных и количественных показателей на индикаторных линиях L929 и СНО-К1 с образцами ФЭ гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100 серий 5, 7, 16, 19, 22, 23, 24 были проведены по единой схеме, описанной в п. 4.2. Сроки наблюдения, критерии оценки результатов были неизменны.

Все семь стерильных образцов гликопротеина капсулы 200 kDa *B. pseudomallei* 100 проявляли различную степень цитопатогенности: гибель клеток

зарегистрирована в диапазоне значений от 1% до 20%; отмечены изменения морфологии клеток обеих линий. Проявлений у клеток токсического эффекта при работе с различными сериями гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* (антиген 200 kDa) не выявлен.



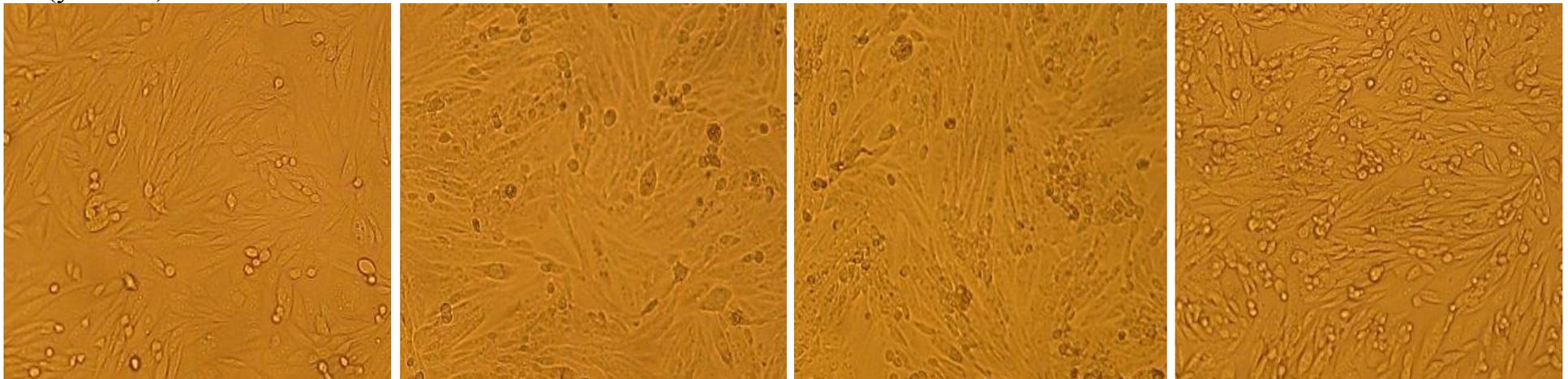
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 7 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии L929 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 100 (ув. 100^x).



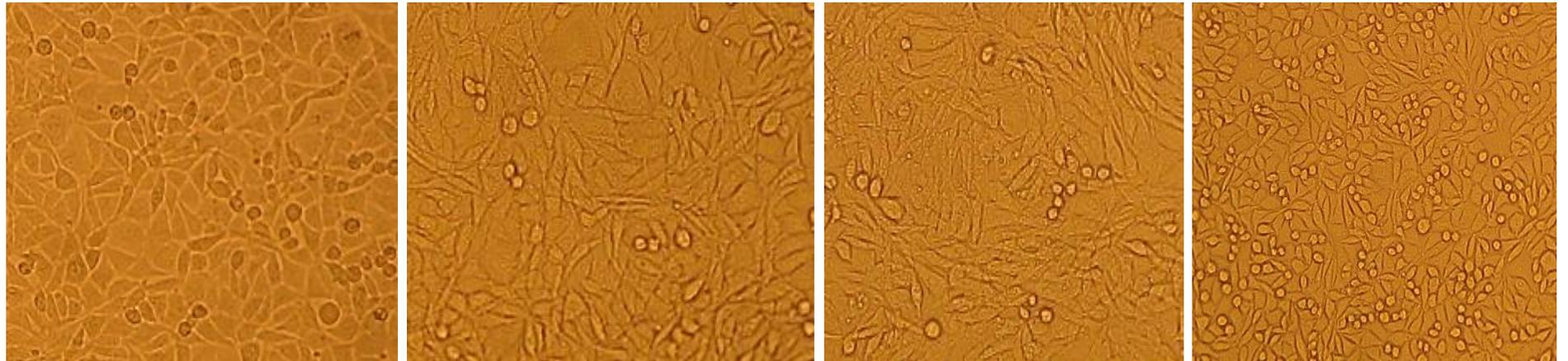
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 8 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии CHO-K1 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 100 (ув. 100^x).



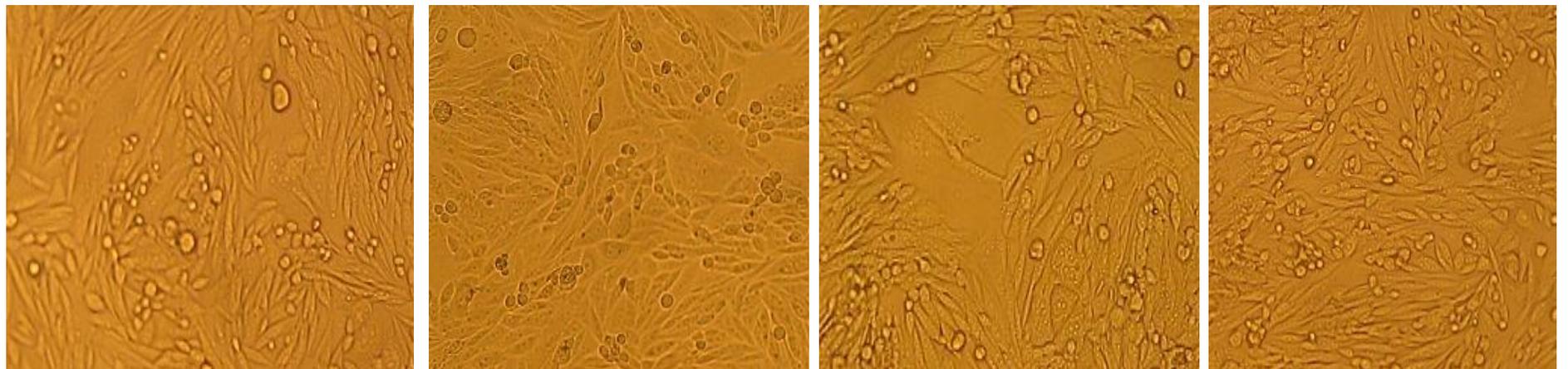
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 9 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии L929 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 57576 (ув. 100^x).



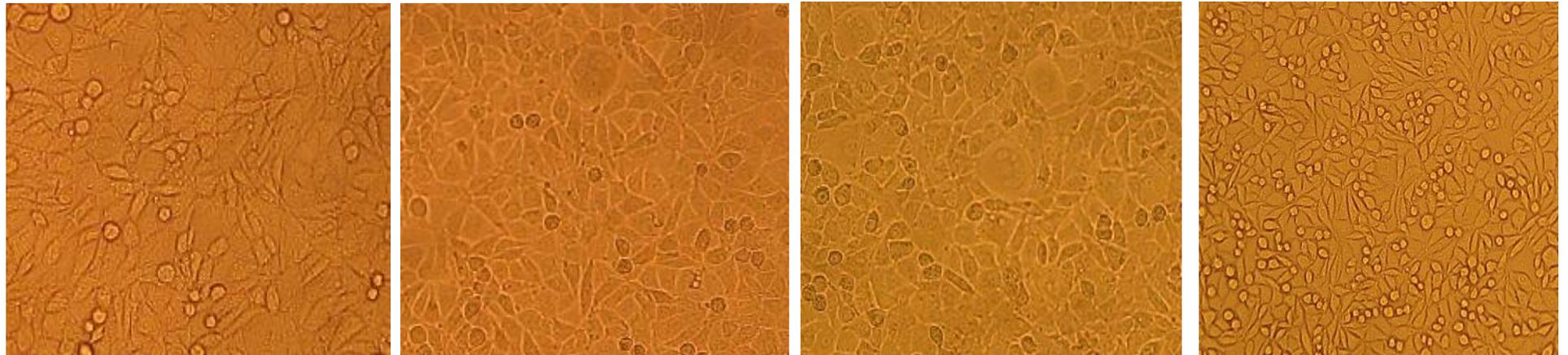
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 10 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии CHO-K1 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 57576 (ув. 100^x).



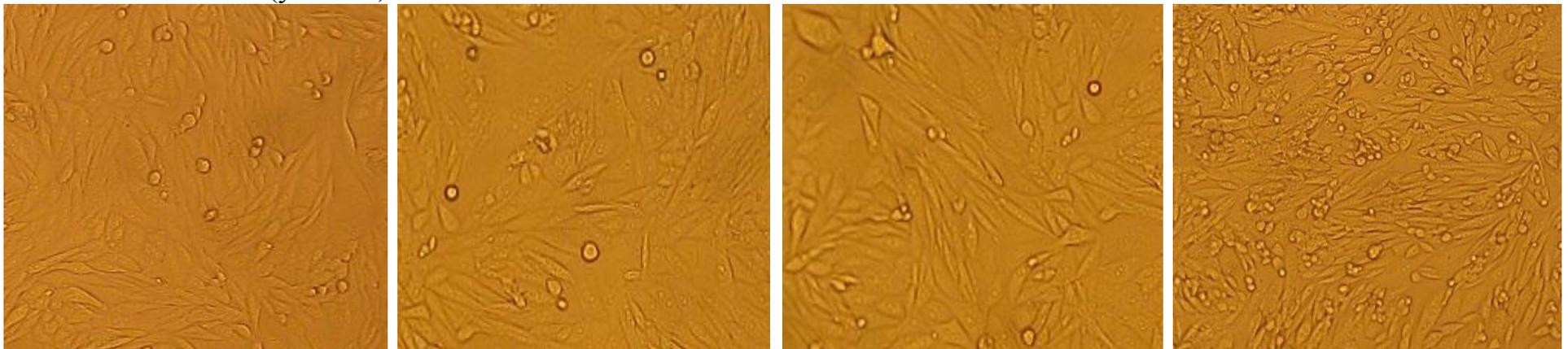
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 11 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии L929 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 51274 (ув. 100^x).



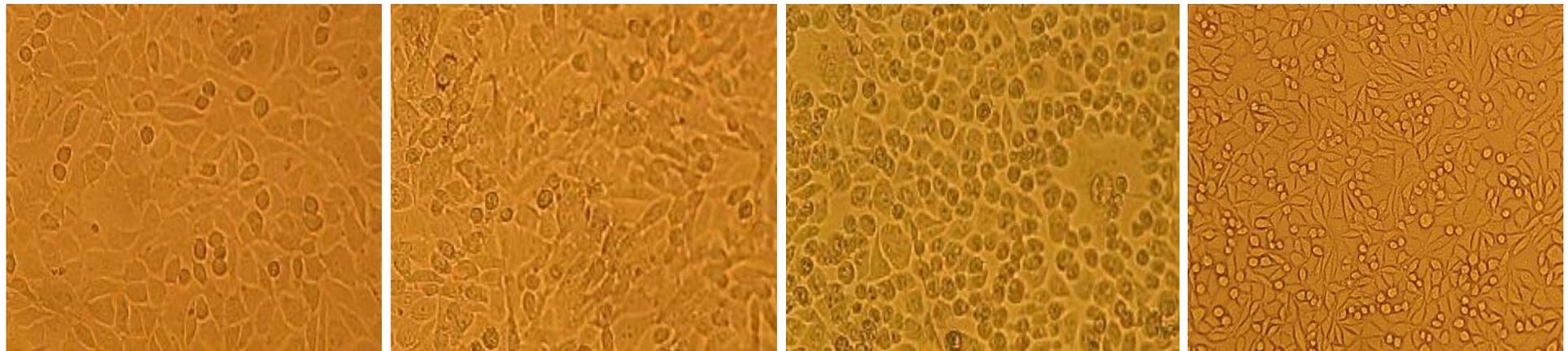
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 12 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии CHO-K1 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 51274 (ув. 100^x).



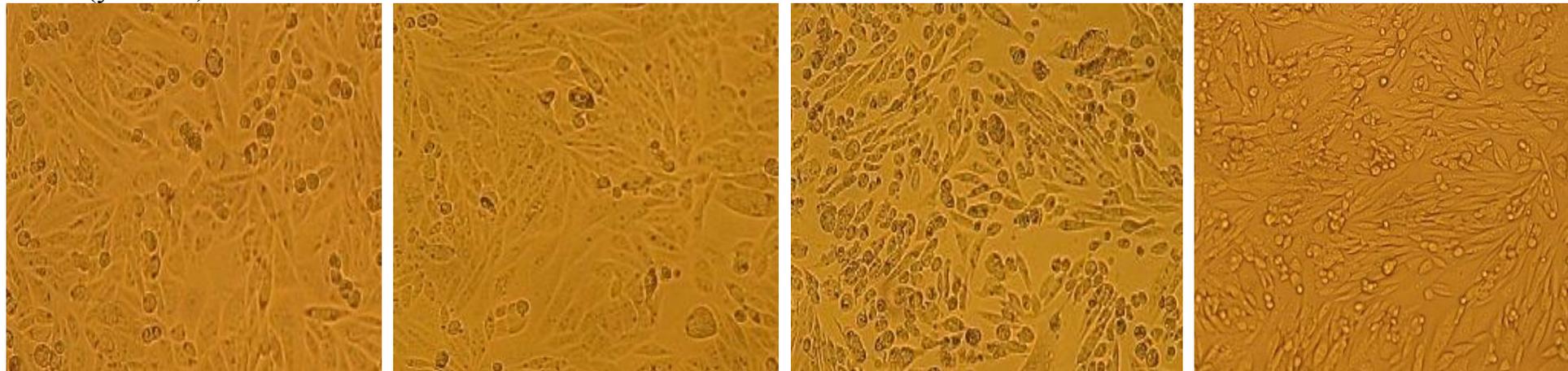
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 13 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии L929 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 59361 (ув. 100^x).



1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 14 – Наблюдаемые изменения в монослое клеток линии CHO-K1 при контакте с ВСЭ *B.pseudomallei* штаммом 59361 (ув. 100^x).

Ниже на рисунке 15 представлены относительные показатели индикаторной линии L929 при воздействии ФЭ.

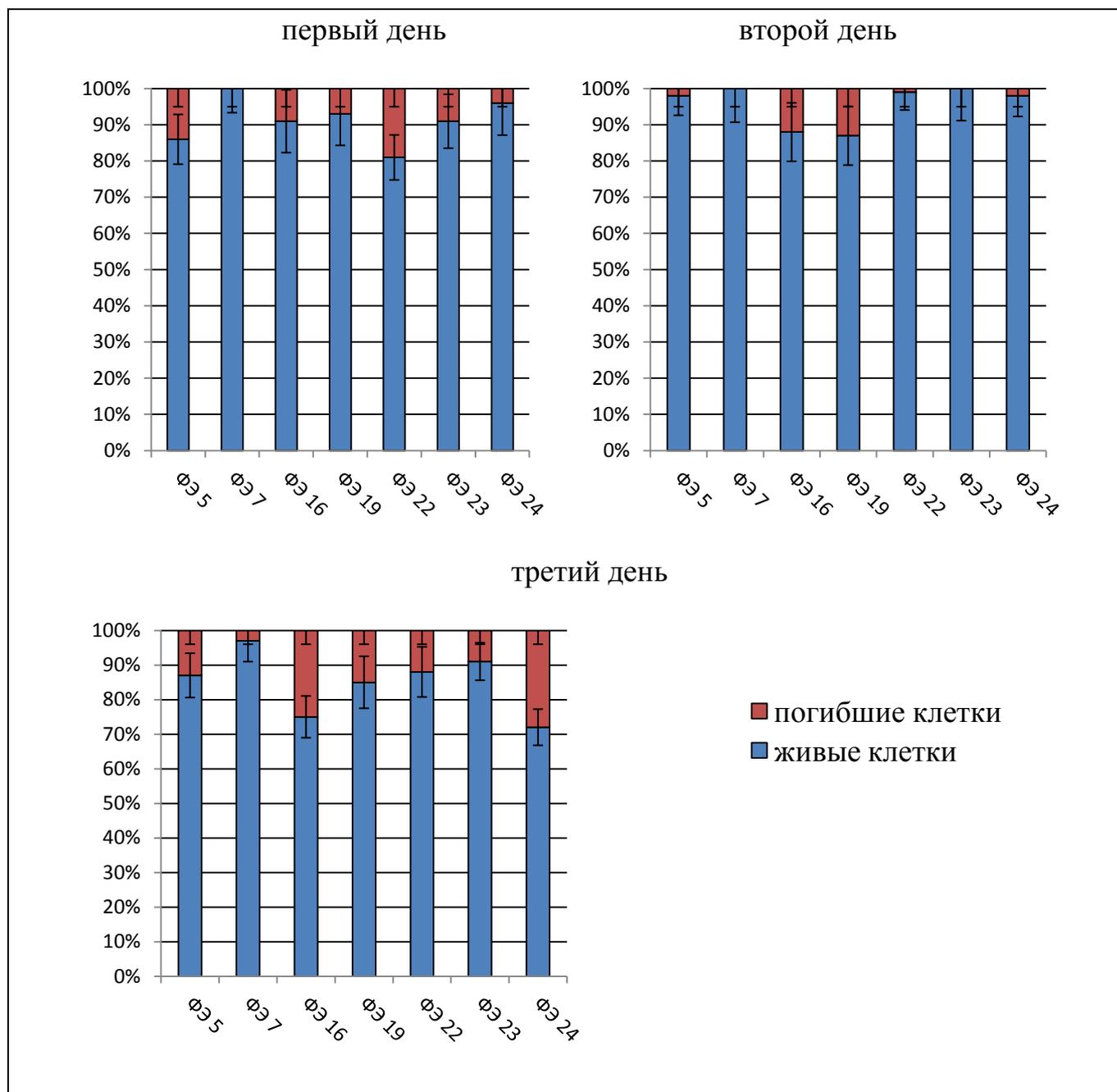


Рисунок 15 – Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в монослое клеточной культуры L929 при контакте с ФЭ в течение всего срока эксперимента.

Результаты проверки цитопатогенности этих же антигенов на монослое СНО-К1 были аналогичны результатам.

Выполненные эксперименты исследования продемонстрировали снижение жизнеспособности клеток L929 и CHO-K1 при прямом воздействии всех семи образцов гликопротеина капсулы 200 kDa *B. pseudomallei* 100 в объеме 40 мкл проявляется в феномене не столько гибели клеток, сколько в снижении темпов их роста и деления в течение всего срока наблюдения.

Полученные данные являются доказательством эффективности использования двух индикаторных культур L929 и CHO-K1 в тесте микроцитотоксичности для изучения токсических свойств антигенов возбудителя мелиоидоза. Данные, получаемые на модели *in vitro* перевиваемых клеточных линий значимы для корректного подбора антигенных компонентов экспериментальных вакцин, эти данные необходимо учитывать при разработке эффективных схем иммунизации экспериментальных животных-продуцентов гипериммунных сывороток, а также животных-доноров (мышей BALB/c) В-лимфоцитов, стимулированных антигенами *B. pseudomallei*, выполняющих роль клеток-партнеров на этапах воспроизведения гибридной технологии получения МКА заданной специфичности.

И наконец, данные, полученные в этих экспериментах, необходимы для определения *in vitro* протективного потенциала МКА на модели стандартизированных клеток-мишеней.

4.3 Множественный скрининг антигенов возбудителя мелиоидоза в микроварианте теста микроцитотоксичности на перевиваемых клеточных линиях человека (сублинии HeLa)

В работе были использованы перевиваемые клеточные линии человека. Их применение было аргументировано в главе 3.

Для постановки основных экспериментов взвесь клеток HeLa S3 и HeLa ТК готовили с такой концентрацией, которая была необходима для выноса в лунки определенного формата (гл.3 табл. 3).

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*.

При анализе данных, полученных в этой серии опытов, установлено, что ВСЭ *B.pseudomallei* 100, 57576, 51274, 59361 обладали пролонгированным цитопатогенным эффектом по отношению к клеткам линии HeLa S3. Такие данные регистрировали в течение всего срока наблюдения за результатами контакта клеток-мишеней с антигеном. В то же время, ВСЭ *B.pseudomallei* 56770, 110, 60913, 56738 проявили различную степень цитопатогенности в отношении индикаторной культуры HeLa S3.

Относительные показатели числа жизнеспособных клеток линии HeLa S3 после контакта с образцами ВСЭ представлены на рисунке 16 в виде графиков в течение всего срока наблюдения.

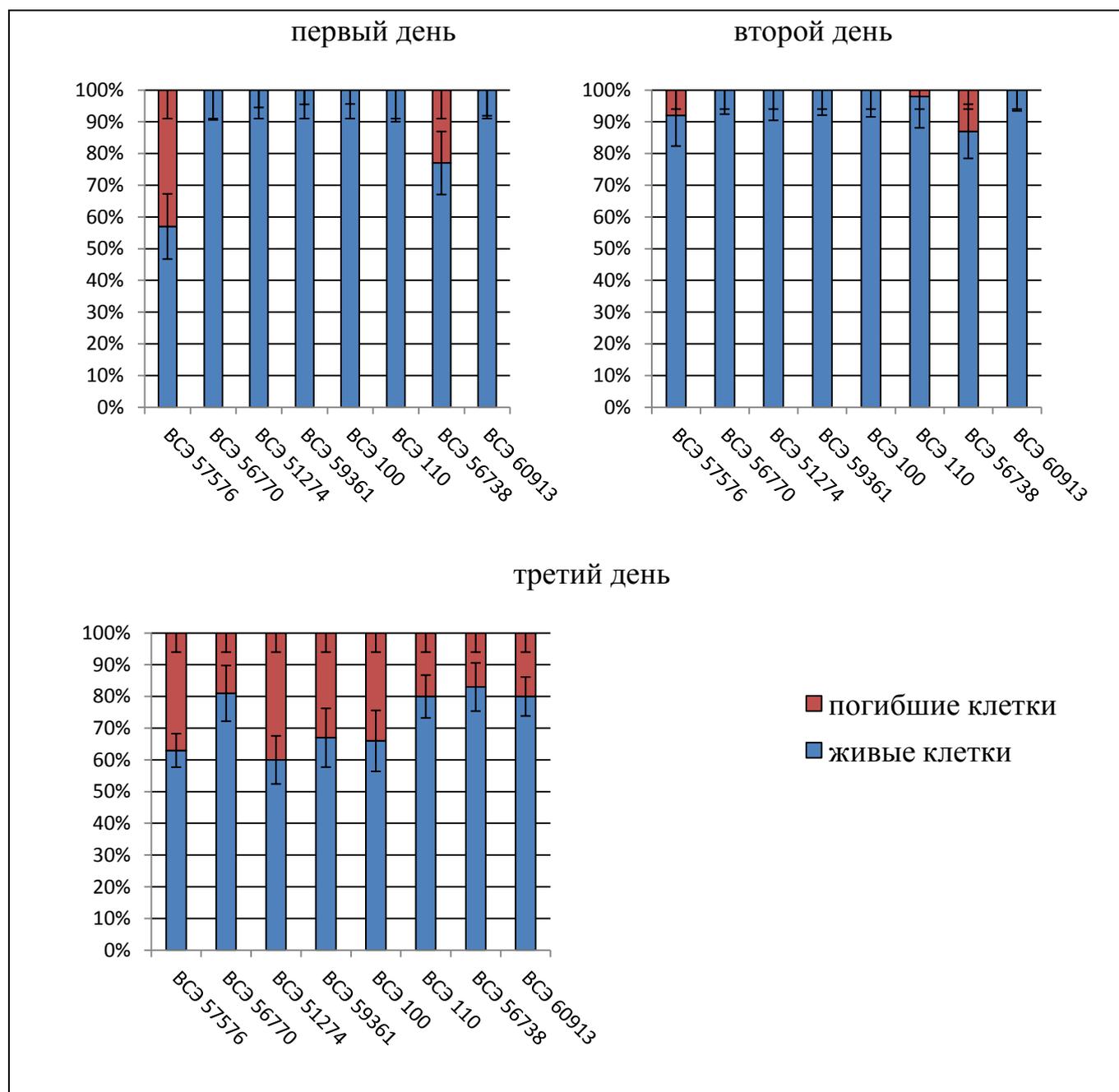


Рисунок 16 – Относительные показатели числа жизнеспособных клеток HeLa S3 при контакте с BCЭ в течение всего срока эксперимента.

Согласно полученным данным, в тесте микроцитотоксичности на модели клеток двух сублиний человеческой эпителиоидной карциномы шейки матки, кривые цитопатогенности обеих линий клеток HeLa S3 и HeLa ТК имеют сходную динамику по пролиферативной активности и чувствительности к

воздействию антигенов возбудителя мелиоидоза. Все результаты этого этапа имеют достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

Таким образом, использование малигнизированных 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 не возможно, так как при работе с ними затруднена стандартизация условий проведения опытов и их воспроизводимость.

Таким образом, установлено, что при использовании метода прямого воздействия потенциально токсического антигена или комплекса антигенов, на этапах выявления *in vitro* цитотоксичности или цитопатогенности растворимых компонентов микробных клеток возбудителя мелиоидоза необходимо использовать две индикаторные перевиваемые линии клеток животных: L929 и СНО-К1.

ГЛАВА 5 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЛИОИДОЗНЫХ МКА РАЗЛИЧНОЙ ЭПИТОПНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ В КАЧЕСТВЕ ЦИТОПРОТЕКТОРОВ *IN VITRO*

В настоящей работе для изучения возможности нейтрализации цитотоксического действия антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* были использованы моноклональные антитела против антигенов *B. pseudomallei* различной эпитопной направленности. Продуцентами этих МКА являлись гибридомы из коллекции лаборатории иммунодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Набор применявшихся образцов состоял из четырех вариантов МКА, взаимодействующих с гликопротеином капсулы *B. pseudomallei* с м.м. 800 kDa (Аг 8 по классификации Н.Н.Пивеня): РрmI, РрmII, 2A₆, 2H₇, трех вариантов МКА (3C₆, 6A₁₁, 6E₇) против эпитопов, экспонированных на гликопротеине 200 kDa, и одного варианта МКА (2F₁₁), направленного против Аг 6 в составе ЛПС буркхольдерий II группы патогенности.

В экспериментах по оценке протективных свойств МКА использовали образцы иммуноглобулинов, выделенные из асцитических жидкостей мышей BALB/c, которым внутрибрюшинно прививали соответствующие гибридомы. Все образцы МКА были подвергнуты изотипированию, которое выявило принадлежность четырех из них к классу IgM (РрmI, 3C₆, 6A₁₁, 6E₇) и четырех – к IgG (РрmII, 2A₆, 2H₇, 2F₁₁). Активность МКА в твердофазном иммуноферментном анализе была равна $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-7}$. После стерилизации образцов методом мембранной фильтрации определяли концентрацию белка в них.

Протективный потенциал индивидуальных образцов МКА оценивали по результатам реакции цитотоксичности, выполнявшейся на модели индикаторных клеток линии L929.

Результаты проверки протективности этих же образцов МКА на монослое СНО-К1 были аналогичны результатам, полученные на модели перевиваемых клеточных линий L929.

Для постановки опытов использовали антигены с подтвержденной токсичностью: ВСЭ *B. pseudomallei* 100, 57576, 51274, 59361 (см. раздел 2 гл.4). Достоверное цитотоксическое воздействие этих антигенов на индикаторные культуры регистрировали в течение всего срока наблюдения ($p < 0,05$).

Перед постановкой основных опытов по нейтрализации антигенов с помощью МКА все образцы этих иммуноглобулинов были проверены на наличие токсических проявлений в отношении суточного монослоя интактных клеточных культур L929 и СНО-К1. Результаты этого своеобразного контроля, продемонстрировавшего отсутствие токсического воздействия МКА (по 0,5 мкг в лунку) на клетки-мишени, представлены графически на рисунке 17. Установлено, что все образцы МКА по сравнению с контролем нативной культуры клеток не вызывали существенных изменений в их состоянии в течение всего срока наблюдения ($p > 0,05$).

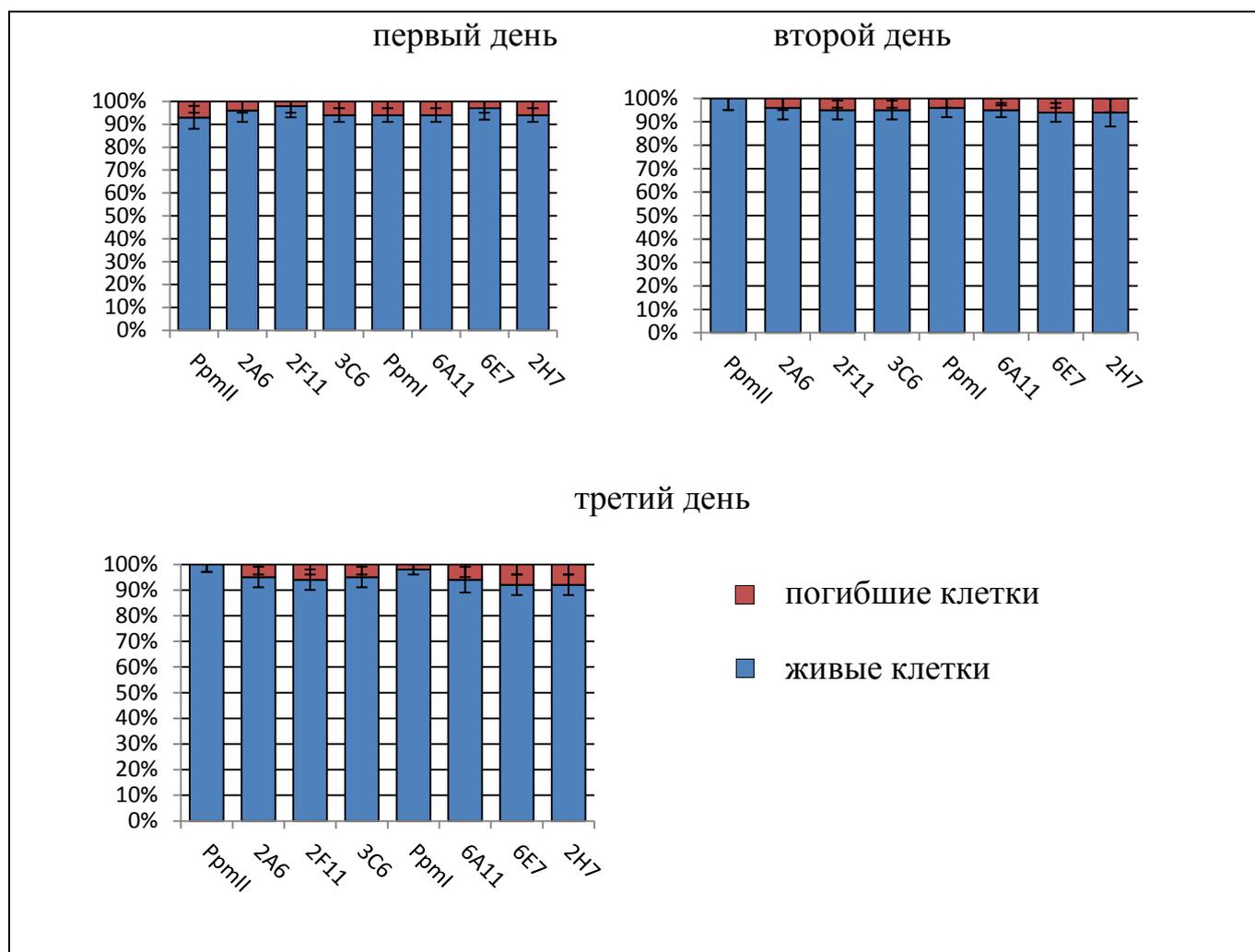


Рисунок 17 – Относительные показатели результатов влияния МКА на интактную клеточную популяцию линии L929 в течение трех суток после формирования монослоя.

Эксперименты по нейтрализации токсичных антигенов возбудителя мелиоидоза были выполнены по единой схеме с использованием двух линий клеток (L929 и CHO-K1): свежетрипсинизированную культуру пересевали 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°C в течение 1 ч смесь 40 мкл антигена с одним из вариантов антител в дозировке по белку 1 мкг, 0,5 мкг, 0,25 мкг. День постановки опыта считали 0. В течение 3 суток ежедневно оценивали качественные и количественные характеристики культур 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).

Известно, что единый подход к выполнению опытов сводит к минимуму ошибки при исследовании протективных свойств МКА на модели клеточных культур, обеспечивает почти идентичные результаты в лунках дублирующих пластин. Поэтому, в соответствии с вышеназванной схемой постановки опыта, были выполнены четыре серии экспериментов, в каждой из которых использовали один из вариантов ВСЭ *B. pseudomallei* и все варианты МКА, отобранные для работы.

Результаты скрининговых исследований по оценке нейтрализующей активности МКА различной эпитопной направленности против ВСЭ *B. pseudomallei* суммированы в таблице 5.

Относительные показатели числа клеток в опытах по оценке протективного потенциала МКА по сравнению с контролем (интактные клетки+антиген) выражены в виде диаграмм на рисунках 19, 20, 23.

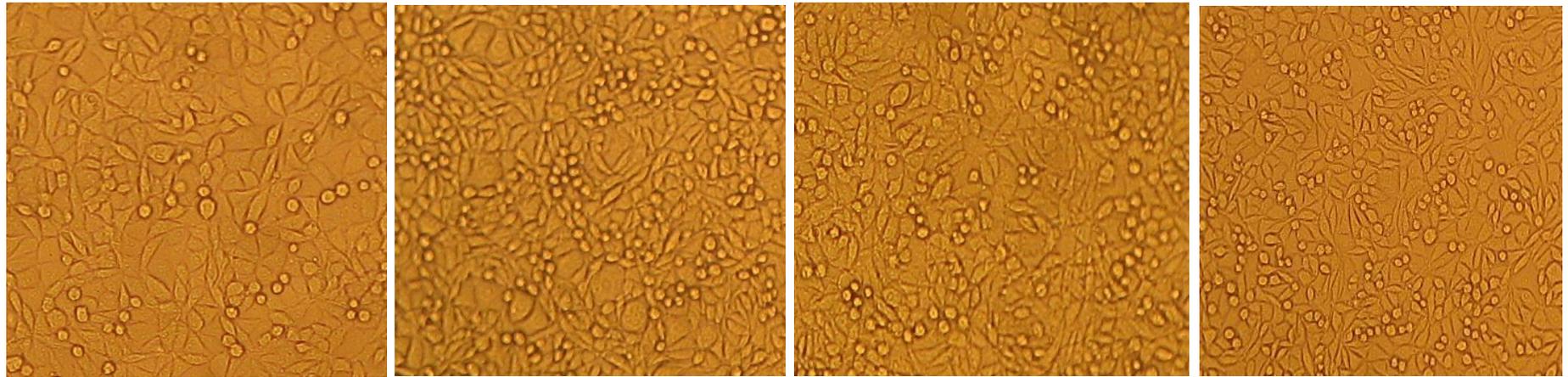
Таблица 5 – Результаты проверки протективных свойств МКА различной эпитопной направленности против антигенов возбудителя мелиоидоза

МКА	Концентрация по	100			57576			51274			59361		
		1 день	2 день	3 день	1 день	2 день	3 день	1 день	2 день	3 день	1 день	2 день	3 день
Потенциал МКА, взаимодействующих с Ag8													
Ppm I	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	0,5	+	-	-	-	-	+	-	-/+	-	-	-	-
	0,25	-/+	-	+	-	-	+	-/+	-/+	+	-	-	-
Ppm II	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-/+	+	-	+	-	-	-
2A6	1	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	0,5	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2H7	1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	0,25	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Потенциал МКА, взаимодействующих с Ag6													
2F11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Потенциал МКА, взаимодействующих с Ag 200 kDa													
3C6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0,5	+	-	+	-	-	-/+	-	+	+	-	+	-
	0,25	-	-	-	-	-	-/+	-	-	+	-	-	-
6A11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0,5	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-/+	-
	0,25	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
6E7	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	0,5	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<p>« + » – положительный результат, подтверждающий достоверную нейтрализацию токсичности Ag с помощью МКА; «-» – отрицательный результат; «-/+» – $p \geq 0,05$</p>													

Согласно данным, обобщенным в этой таблице 5, 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 при уменьшении дозировки МКА в два раза, до 0,5 мкг.

Результаты применения индивидуальных образцов МКА для нейтрализации токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 100 на клетки-мишени линии L929 (при n=6) свидетельствовали о том, что через сутки после внесения в лунки с монослоем восьми различных смесей (антиген+одно из МКА) достоверный положительный результат был зарегистрирован в четырех случаях: нейтрализация токсичности антигена была достигнута при использовании МКА Ppm I (0,5 мкг), МКА 2A₆ (1 мкг), МКА 2F₁₁ (0,5 мкг) и МКА 3C₆ (0,5 мкг). Следует отметить, что МКА Ppm I и МКА 2A₆ в последующие дни наблюдения (вторые и третьи сутки) утратили способность защищать клетки-мишени от токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 100, в то время, как МКА 2F₁₁ против эпитопа Ag 6 в дозировке 0,5 мкг стабильно нейтрализовало антиген в течение всего срока наблюдения. На рисунке 18 представлена нейтрализация токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 100 с помощью МКА 2F₁₁. В последующие двое суток эффективная нейтрализация токсичных компонентов смеси растворимых антигенов, экстрагированных из *B. pseudomallei* 100, была достигнута с помощью МКА 2H₇, 6A₁₁ и 6E₇ (по 0,5 мкг в каждом из вариантов).

Некоторые образцы МКА проявили способность защитить клетки-мишени от токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 100 только к концу срока наблюдения. Так, МКА, взаимодействующие с эпитопами Ag 8 (Ppm II) и 200 kDa (3C₆) к концу третьих суток продемонстрировали разную степень протективности по отношению к индикаторным культурам в дозировке 0,5 мкг, а МКА (Ppm I, 2H₇) - в дозировке 0,25 мкг. Ниже на рисунке 19 представлены результаты проверки протективности МКА в отношении ВСЭ *B. pseudomallei* 100.



1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 18 – Нейтрализация токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 100 на клетки-мишени линии L929 с помощью МКА 2F₁₁ в дозировке 0,5 мкг в течение всего срока наблюдения (ув. 100^x).

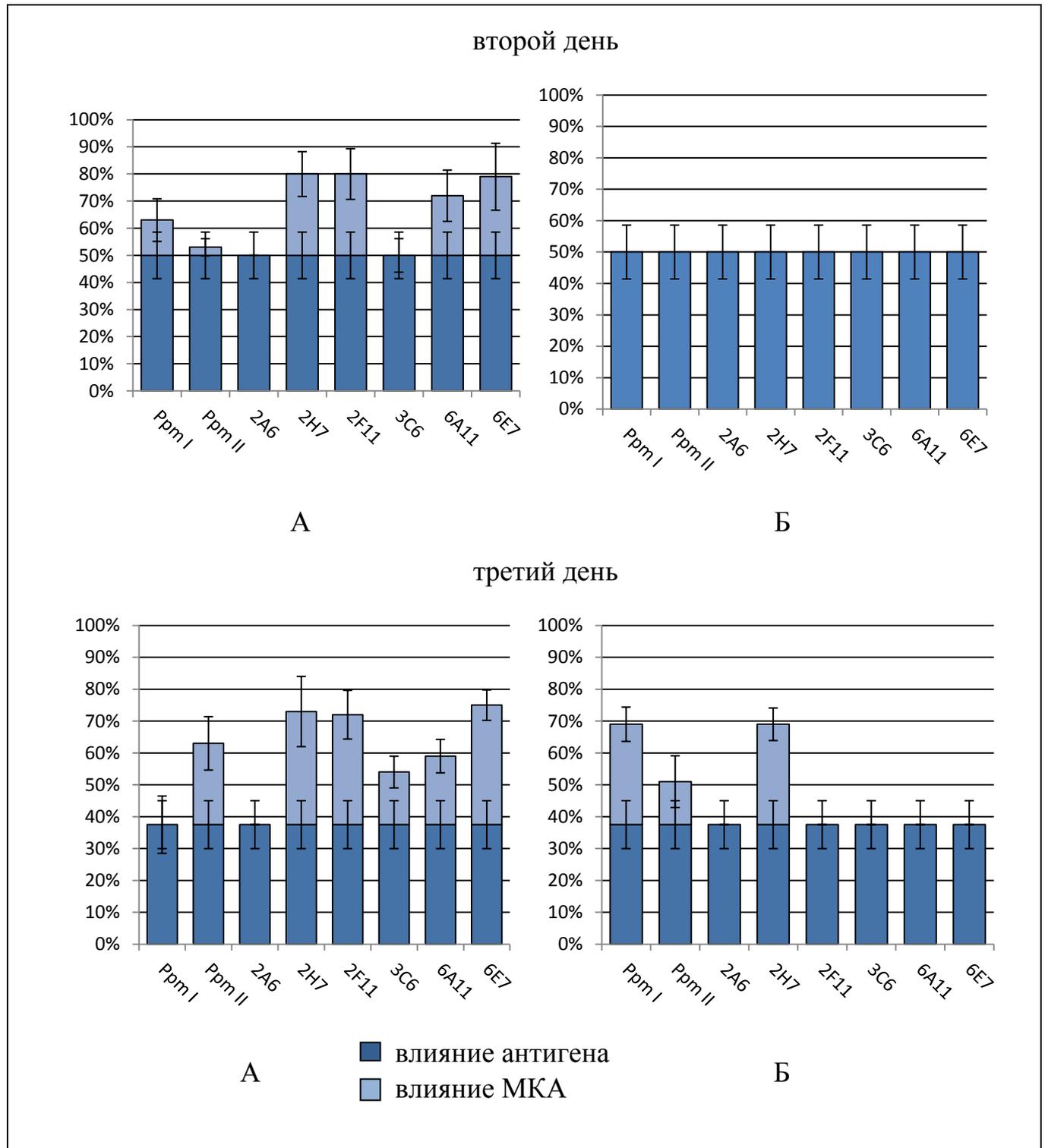


Рисунок 19 – Результаты проверки протективных свойств МКА (■), выраженные в относительных величинах значений числа выживших индикаторных клеток линии L929 по сравнению с контролем (Аг - ВСЭ *V. pseudomallei* 100; А – МКА 0,5 мкг; Б – МКА 0,25 мкг). Сроки наблюдения – 2 и 3 сутки.

В целом, при проверке протективности всех вариантов МКА были получены данные об их способности защищать индикаторные клетки от токсического воздействия антигенов *B. pseudomallei* 100.

Достоверную защиту клеток-мишеней во второй день наблюдения обеспечивали 4 варианта МКА (2Н₇, 6А₁₁, 6Е₇, 2F₁₁ все в дозировке 0,5 мкг), в третий день - 7 вариантов МКА (Рpm II (0,5), 2Н₇ (0,5 и 0,25), Рpm I (0,25), 2F₁₁, 3С₆, 6А₁₁, 6Е₇ (все по 0,5). Все названные варианты МКА способствовали увеличению числа выживших клеток в тесте микроцитотоксичности по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Последующие этапы исследований были выполнены согласно описанной выше схеме проверки протективного потенциала МКА в части защиты индикаторных клеток от токсического воздействия антигена. Единственное отличие в условиях постановки реакции касалось замены антигена: в опыте был использован образец ВСЭ *B. pseudomallei* 57576 с подтвержденной токсичностью в отношении клеток линии L929.

В первые два дня после начала эксперимента были зарегистрированы по два положительных результата, обусловленных эффективной нейтрализацией токсичных компонентов смеси антигенов *B. pseudomallei* 57576 МКА 2А₆ (0,5 мкг и 1 мкг) и МКА 6А₁₁ (0,5 и 0,25 мкг) ($p < 0,05$).

Результаты третьего дня наблюдения представлены на рисунке 20. Установлено, что из восьми проверенных четыре МКА (Рpm I, 2А₆, 2Н₇ и 6А₁₁ в дозировке 0,5 мкг каждое) достоверно защищает индикаторные клетки от токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 57576 ($p < 0,05$). Даже при понижении дозировки антител до 0,25 мкг МКА Рpm I и 2Н₇ достоверность отличий показателей числа выживших клеток по сравнению с контролем подтверждалась ($p < 0,05$).

Следует отметить, что в процессе выполнения данного фрагмента исследований по оценке протективного потенциала МКА различной эпитопной направленности выявлено, что МКА 6Е₇ и 2F₁₁ не обладают способностью

нейтрализовать токсичность антигенов *B. pseudomallei* 57576 потому, что не находят в этой сложной по составу смеси эпитопы, гомологичные своим активным центрам связывания с антигеном, в отличие от взаимодействия с антигеном *B. pseudomallei* 100.

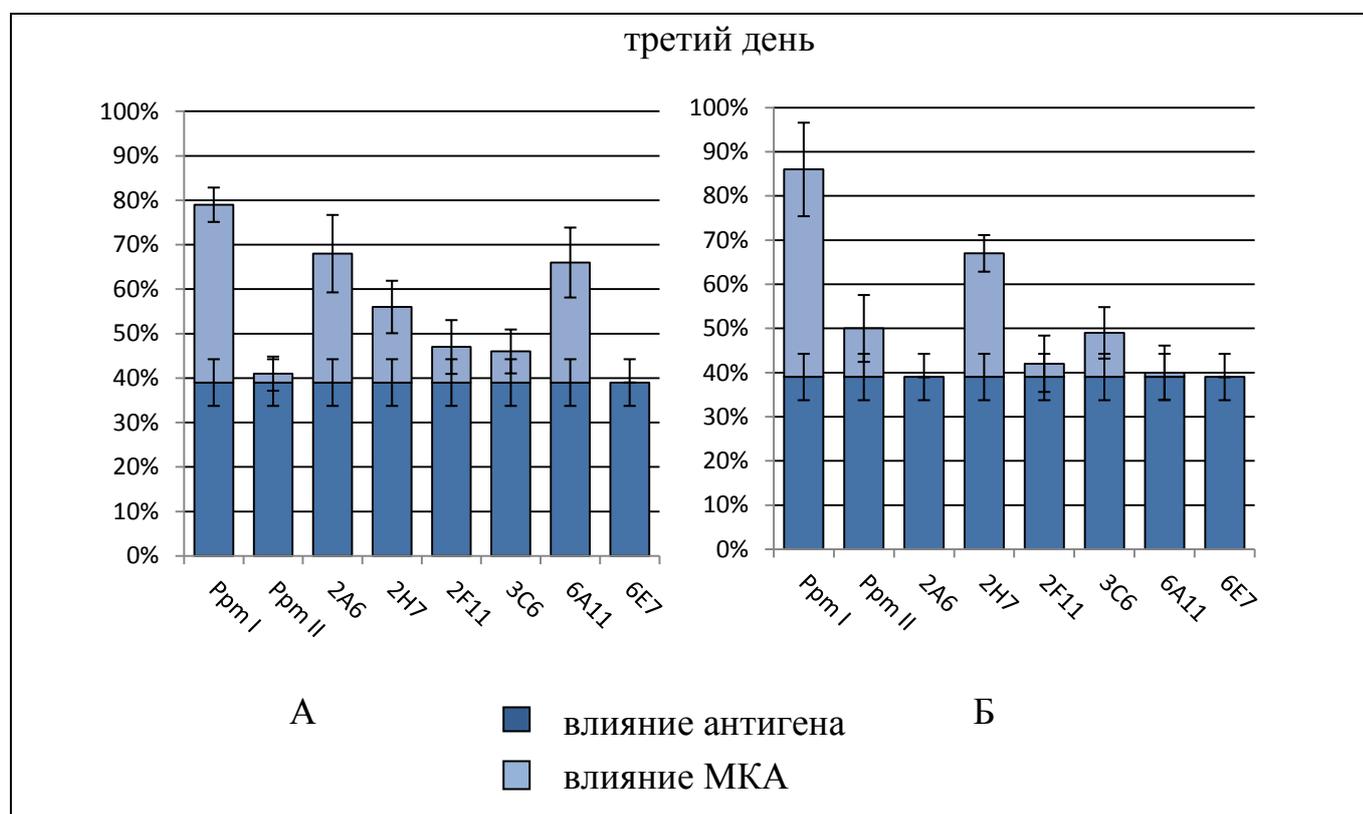
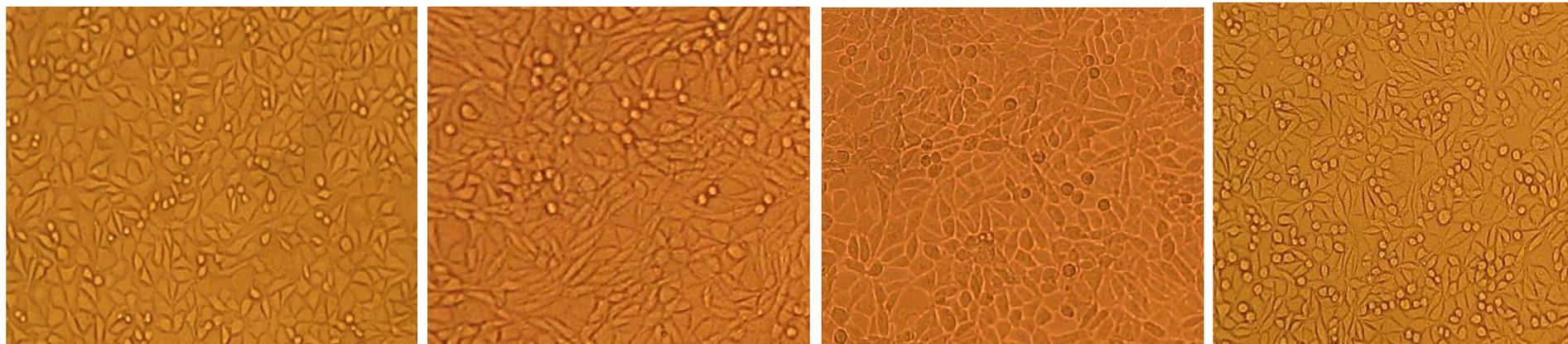


Рисунок 20 – Результаты проверки протективных свойств МКА (■), выраженные в относительных величинах значений числа выживших индикаторных клеток линии L929 по сравнению с контролем (Аг - ВСЭ *B. pseudomallei* 57576; А – МКА 0,5 мкг; Б – МКА 0,25 мкг). Срок наблюдения – 3 сутки.

При нейтрализации цитотоксического воздействия *B. pseudomallei* 51274 на клетки-мишени L929 и СНО-К1 в первый день наблюдения эффективными цитопротекторами оказались МКА Ppm II (0,25 мкг), а также МКА 2F₁₁ и 2H₇ (0,5 мкг) ($p < 0,05$) (рисунок 21, 22). Результаты последующих двух дней, в течение которых проявления протективного потенциала антител нарастали, представлены

на рисунке 23. Установлено, что во второй день наблюдения МКА 2Н₇, 2F₁₁, 3С₆, 6А₁₁ и 6Е₇ достоверно нейтрализуют токсичность гомологичных им антигенов *B. pseudomallei* 51274 ($p < 0,05$). К концу срока наблюдения (3 сутки) были получены доказательства эффективности применения всех восьми вариантов МКА для защиты индикаторных культур от токсического воздействия смеси водорастворимых антигенов микробных клеток *B. pseudomallei* 51274 ($p < 0,05$).



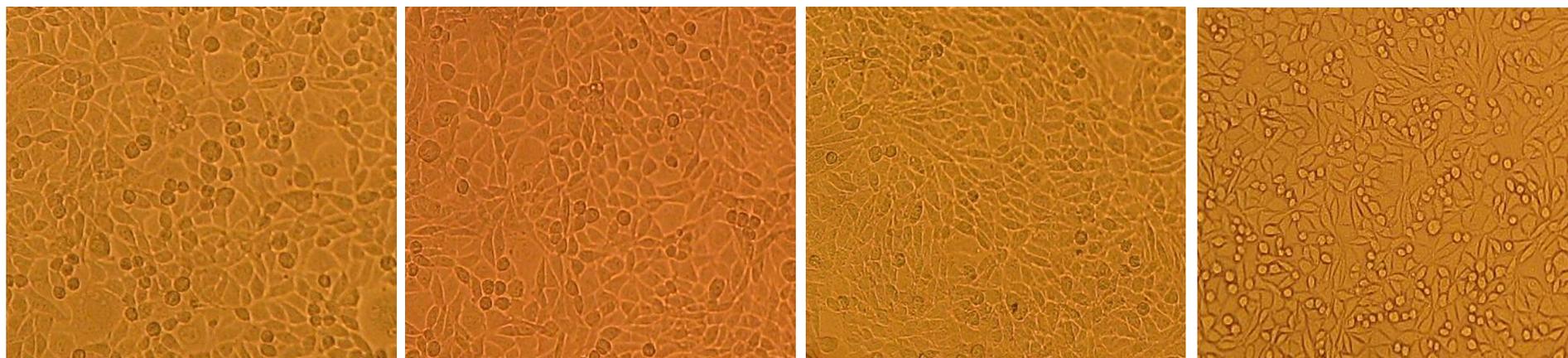
1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 21 – Нейтрализация токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 51274 на клетки-мишени линии L929 с помощью МКА 2F₁₁ в дозировке 0,5 мкг в течение всего срока наблюдения (ув. 100^x).



1 сутки

2 сутки

3 сутки

контроль

Рисунок 22 – Нейтрализация токсического воздействия ВСЭ *B. pseudomallei* 51274 на клетки-мишени линии L929 с помощью МКА 2H₇ в дозировке 0,5 мкг в течение всего срока наблюдения (ув. 100^x).

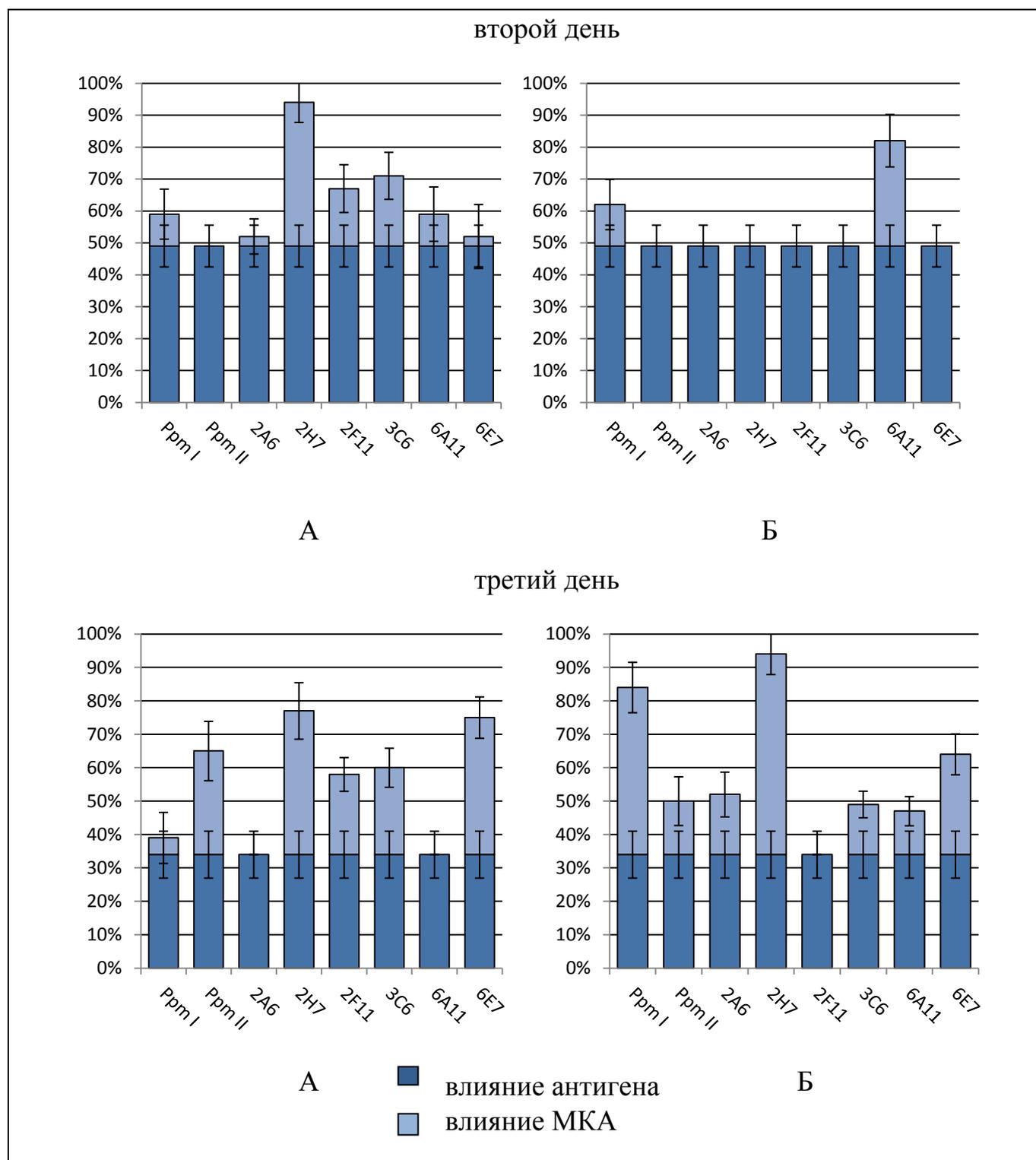


Рисунок 23 – Результаты проверки протективных свойств МКА (■), выраженные в относительных величинах значений числа выживших индикаторных клеток линии L929 по сравнению с контролем (Аг - ВСЭ *B. pseudomallei* 51274; А – МКА 0,5 мкг; Б – МКА 0,25 мкг). Сроки наблюдения – 2 и 3 сутки.

Данные, полученные в процессе изучения протективного потенциала МКА в части защиты индикаторных клеток от токсического воздействия ВСЭ *V. pseudomallei* 59361 свидетельствовали о низкой эффективности использованной в работе панели МКА для нейтрализации токсичности данного комплекса антигенов, подтвержденной экспериментально (гл.4, п.4.2.1). Положительные результаты были получены только в двух случаях: МКА Ppm I, направленные против эпитопов Ag 8, защищали перевиваемые клеточные линии в дозировке 1 мкг только к концу срока наблюдения, а МКА 3C₆ против эпитопов антигена 200 kDa проявили протективные свойства в дозировке 0,5 мкг во второй день ($p < 0,05$). По всей видимости, набор растворимых антигенов данного штамма возбудителя мелиоидоза, вызывавших токсическое воздействие на индикаторные культуры, не соответствовал профилю специфической активности большинства использованных в работе вариантов моноклональных иммуноглобулинов, что обусловило низкую эффективность их применения.

В целом, результаты экспериментов, обобщенных в данной главе, демонстрируют возможности применения альтернативной модели перевиваемых клеточных культур с известными свойствами для оценки протективного потенциала МКА, взаимодействующих с эпитопами антигенов, отнесенных к факторам вирулентности возбудителя мелиоидоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Области применения альтернативных методов оценки токсичности различных биополимеров *in vitro* взамен общепринятого метода постановки биопробы постепенно расширяются, внедряясь, в том числе, в прикладные разделы микробиологии и иммунологии. Опубликованы данные о том, что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [10].

К альтернативным отнесены методы использования беспозвоночных организмов, растений, микроорганизмов, эмбрионального и личиночного материала, культур клеток, а также физических и химических методов [20; 31; 38]. В то же время, следует отметить, что большая часть публикаций посвящена применению клеточных моделей. Эти модели используют не только для оценки токсичности *in vitro* гомогенных по составу экзопродуктов микробной клетки (токсинов), но и для изучения более сложных комплексов, изолируемых из различных структурных элементов микроорганизмов.

С 1999 года в нашей стране действует Государственный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 [7], 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.

В практической работе такая проверка может предоставить дополнительную информацию об антигенном материале, используемом для иммунизации животных-продуцентов гипериммунных диагностических или лечебных сывороток, а также при выполнении одного из этапов гибридомной технологии: при стимуляции В-лимфоцитов мышей-доноров иммунных спленоцитов различными антигенами.

Известно, что возбудитель мелиоидоза продуцирует ряд биологически активных соединений, в том числе токсина(ов), частично охарактеризованных, выявляемых чаще всего в жидких средах культивирования, входящих в группу соединений, отнесенных к факторам вирулентности и патогенности *B.pseudomallei*. Кроме того, наличие тяжелых форм мелиоидоза, осложненных септицемией с множественными некротическими поражениями внутренних органов, трудно поддающихся антибактериальной терапии, а также молниеносных форм этой инфекции, косвенно свидетельствуют об участии в патогенезе заболевания токсичных продуктов, синтезируемых данной буркхольдерией.

Несмотря на то, что в последние годы интенсивно развивается направление по оценке токсичности различных биологически активных соединений, исследования в части определения степени токсичности или цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза проводили ранее в ограниченном объеме.

В рамках настоящей работы изучение потенциально токсичных компонентов в составе микробных клеток *B.pseudomallei* потребовало обоснованного выбора биологической модели такого типа, которая обладает определенным набором характеристик, основными из которых являются: доступность, стандартность, высокая чувствительность. Этим критериям в полной мере соответствует клеточная модель тестирования испытуемого вещества *in vitro*.

В соответствии с вышеизложенным была сформулирована цель настоящего исследования, предусматривавшая разработку 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.

Несмотря на то, что в работе были использованы коллекционные паспортизированные линии клеток с известными свойствами, считали

необходимым до начала основных опытов по проверке цитотоксичности антигенов *B. pseudomallei* выполнить ряд подготовительных этапов.

При выполнении этих этапов использовали основные принципы методов управляемого культивирования, реализация которых обеспечивает максимально возможную стандартизацию испытаний и повышает достоверность получаемых результатов.

Прежде всего, были детализированы условия культивирования отобранных для экспериментов перевиваемых клеточных линий, изучены их морфофункциональные свойства в предлагаемых условиях, определены сроки формирования монослоя, сроки адаптации клеток ко всем условиям, включая подбор серий пластиковой посуды различного формата, а также проанализированы особенности восстановления пролиферативной активности популяций после выведения из криоконсервированного состояния, определены сроки учета результатов и критерии оценки изменений клеток различных линий вследствие токсического воздействия на них различных антигенов. Затем были выполнены этапы подбора посевных доз для каждой популяции клеток в лунки пластин различного формата.

Технологические особенности подготовки клеточной модели для изучения токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* отражены в разделах инструктивно-методического документа учрежденческого уровня внедрения.

Подготовительный этап культивирования клеток был завершен разработкой рекомендуемых условий постановки основных опытов по определению цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза: формат культуральных пластин 24-луночная пластина, стартовая посевная доза – $1,6 \cdot 10^5$ клеток в объеме 0,5 мл в лунки для клеток L929, CHO-K1, время внесения антигена через сутки после образования монослоя. Для клеток HeLa S3 и HeLa ТК стартовая доза была равна $1,0 \cdot 10^5$ в эквивалентном объеме, а внесение антигена осуществляли сразу после посева клеток в лунки.

Наиболее значимыми итогами данного раздела работы, обобщенными в главе 3, явились данные о высоких показателях жизнеспособности клеток

коллекционных линий животных (L929 и CHO-K1) и человека (HeLa S3 и HeLa ТК), выведенных из криоконсервированного состояния (более 90 %), сроках их адаптации к оптимизированным условиям культивирования (не менее 2 недель), сроках выполнения эксперимента без смены среды культивирования при условии отсутствия признаков истощения среды выращивания (3 суток).

В целом, оптимизация всех перечисленных выше условий работы была направлена на стандартизацию постановки реакций цитотоксичности с учетом индивидуальных особенностей каждой из перевиваемых клеточных линий.

Эффективность применения стандартизированной клеточной модели для выявления цитотоксического или цитопатологического воздействия биополимеров была подтверждена в опытах с перевиваемыми культурами клеток (L929, CHO-K1,) и сложными по составу антигенами *B. pseudomallei*. В результате выполнения нескольких 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 (CHO-K1). Эти линии животных 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, а также определены те варианты экспериментов, в которых они являются линиями выбора.

Итогом проверки антигенов *B. pseudomallei* (образцы ВСЭ и гликопротеина капсулы с м.м. 200 kDa) на модели двух индикаторных линий, L929 и CHO-K, явились достоверные данные о цитотоксичности четырех водорастворимых антигенов из восьми проверенных образцов и цитопатогенности гликопротеина 200 kDa, маркера вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза.

Максимально выраженный цитотоксический эффект в течение срока наблюдения оказывали ВСЭ *B. pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, 59361 при прямом контакте с монослоем индикаторных клеток L929 и СНО-К1.

Обе индикаторные линии обеспечивали сопоставимые результаты в части определения цитотоксичности и цитопатогенности, выполнявшегося по методу прямого воздействия антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* на клетки-мишени, а также при изучении свойств образцов гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100 с м.м. 200 kDa. Следует отметить, что клетки линии СНО-К1 в ряде случаев проявляли более высокую чувствительность в отношении антигенов возбудителя мелиоидоза.

Другие закономерности развития процесса гибели клеток-мишеней и проявления цитопатогенности при прямом контакте антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* были отмечены при работе с клеточными линиями HeLa S3 и HeLa ТК. Полученные данные свидетельствовали о том, что их использование в качестве индикаторных культур возможно только в ограниченном объеме, так как при работе с этими линиями клеток затруднена стандартизация условий проведения опытов и их воспроизводимость.

В целом, в результате изучения динамики гибели клеток-мишеней при прямом воздействии потенциально токсичных антигенов или комплекса антигенов на этапах выявления *in vitro* цитотоксичности или цитопатогенности растворимых компонентов микробных клеток возбудителя мелиоидоза были получены данные о таких изменениях, которые можно регистрировать в диапазоне от резко выраженного токсического воздействия до минимальных цитопатологических изменений в клетках индикаторных линий L929 и СНО-К1.

Разработанный вариант тестирования цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* с использованием клеточной модели относительно прост в исполнении, универсален, воспроизводим и пригоден для проведения множественного скрининга антигенов *B. pseudomallei*. Получаемые таким способом данные значимы при работе с образцами экспериментальных химических вакцин, а также антигенным материалом, используемом для

иммунизации животных. Тест микроцитотоксичности может найти применение в качестве дополнительного метода при корректном выборе антигенного материала для воспроизведения различных схем иммунизации животных-продуцентов гипериммунных сывороток, при изучении динамики накопления токсичных метаболитов в жидких питательных средах выращивания штаммов *B. pseudomallei* с различной вирулентностью для биомоделей, при отборе штаммов-продуцентов токсичных биополимеров *B. pseudomallei*, а также при выборе эффективных цитопротекторов, в том числе различных вариантов мелиоидозных МКА, защищающих ткани макроорганизма от токсического воздействия компонентов микробных клеток патогенных буркхольдерий.

Последнему из перечисленных вариантов возможного применения разработанной клеточной модели посвящен завершающий этап исследований, связанный с изучением возможности защиты клеток-мишеней от токсического воздействия антигенов *B. pseudomallei* с помощью специфических иммуноглобулинов.

Апробация в качестве цитопротекторов мелиоидозных моноклональных антител (МКА) против различных эпитопов антигенов, отнесенных к факторам вирулентности данного микроорганизма, свидетельствовала об эффективности их применения и целесообразности такого подхода к решению одной из задач настоящего исследования.

Панель МКА, использованных в работе, состояла из трех вариантов: 1) антитела, взаимодействующие с гликопротеином капсулы *B. pseudomallei* с м.м. 800 kDa (Аг 8): МКА РрmI, РрmII, 2А₆ и 2Н₇; 2) МКА 3С₆, 6А₁₁, 6Е₇ против эпитопов, экспонированных на гликопротеине 200 kDa, и 3) МКА 2F₁₁, взаимодействующее с Аг 6 в составе ЛПС.

Для постановки опытов использовали антигены с подтвержденной токсичностью (глава 4): ВСЭ *B. pseudomallei* 100, 57576, 51274, 59361.

До проведения основных экспериментов в этой серии опытов была проведена проверка всех образцов МКА на наличие/отсутствие токсических проявлений в отношении суточного монослоя интактных клеточных культур. Отсутствие

какого-либо значимого патологического воздействия антител на интактные клетки-мишени являлось основанием для начала основного этапа изучения протективного потенциала различных МКА.

Опыты по нейтрализации токсичных антигенов возбудителя мелиоидоза были выполнены по единой схеме, в 6-кратной повторности, с использованием двух линий клеток (L929 и СНО-К1) с соблюдением всех требований, предъявляемых к тестированию цитопротекторов в части варьирования дозировок, учета результатов и оценки их достоверности. В результате выполнения данного раздела работы 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 с помощью шести различных вариантов МКА 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 ($p < 0,05$). В опытах с антигенами *B. pseudomallei* 57576, 51274 были зарегистрированы достоверные положительные результаты в случаях применения четырех из восьми и пяти из восьми вариантов МКА соответственно ($p < 0,05$).

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 ($p < 0,05$).

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. По всей видимости, набор растворимых антигенов данного штамма возбудителя мелиоидоза не соответствовал профилю специфической активности большинства использованных в работе вариантов МКА, что обусловило низкую эффективность их применения. В подобных случаях следует более подробно изучить антигенный профиль нетипичного штамма *B. pseudomallei* и его особенности, а также повторить эксперименты с панелью МКА другой эпитопной направленности.

В целом, были получены данные о способности индивидуальных образцов МКА защищать индикаторные клетки от токсического воздействия антигенов *B. pseudomallei*, что демонстрирует возможность использования клеточной модели *in vitro* для получения достоверной информации о вариантах антител с наиболее высоким протективным потенциалом, на которые следует обратить внимание при создании экспериментальных смесей моноклональных иммуноглобулинов, так называемых «коктейлей», способных защитить макроорганизм от токсических компонентов микробных клеток.

Таким образом, 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 ТК) 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 (Аг 8 и 200kDa) и ЛПС(Аг6) *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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л: Медгиз, 1962. – 280 с.
2. Буркин, М.А. Изучение иммунохимических свойств антигенов *Bordetella pertussis* как компонентов бесклеточной вакцины с помощью моноклональных антител: дис. ...канд. мед. наук: 14.00.36 / Буркин Максим Алексеевич. – М., 1997. – 100 с.
3. Буркин, М.А. Сравнение пригодности методов количественного определения коклюшного токсина в микрокультуре клеток и некоторых вариантах ИФА при использовании моноклональных антител / М.А. Буркин, В.В. Свиридов // Биотехнология. – 1997. – № 2.– С. 59 – 64.
4. Вечканов, Е.М. Клеточная инженерия / Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина. – Ростов н/Д: ЮФУ, 2012. – 134 с.
5. Вилсон, Э. Сохранение и оценка качества клеток // в кн.: Культура живых клеток. Методы. / Под ред. Фрешни Р. – М.: Мир, 1989. – С. 256 – 303.
6. Гаспарян, Г.О. Альтернативная *in vitro* токсикология: настоящее и будущее в Армении / Г.О. Гаспарян, Р.М. Григорян, Н.К. Саркисян и др. // НАМЖ. – 2009. – Т. 3, № 2. – С. 49-57.
7. ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М.: Госстандарт, 1999. – 12 с.
8. Данлыбаева, Г.А. Цитотоксичность карборанилсодержащих соединений / Г.А. Данлыбаева, А.А. Жылкибаев, В.А. Рыков и др. // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 3. – С. 49-54.
9. Данченко, Е. О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур / Е.О. Данченко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 2. – С. 22 – 31.

10. Дмитриева, М.Н. Оценка количества дифтерийного токсина и его активности разными тестами в динамике культивирования *Corynebacterium diphtheria* PW8 / М.Н. Дмитриева, И.М. Грубер, Н.А. Гаврилова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1999. – № 2. – С. 32 – 35.
11. Дмитруха, Н.Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях / Н.Н. Дмитруха // *Medix Anti-Aging*. – 2013. – № 3. (33) – С. 50 – 55.
12. Дроздов, Ф.В. Цитотоксичные производные (22R, 23R)-дигидроксистигмастана / Ф.В. Дроздов, А.Р. Мехтиев, Г.Е. Морозевич и др. // *Биоорган. химия*. – 2007. – № 33. – С. 349 – 356.
13. Дядищев, Н.Р. Биологические модели *in vitro* в токсикологии / Н.Р. Дядищев, С.П. Рыбалкин, А.И. Марченко // Тезисы докл. 1 съезда токсикологов России. – 1998. – С. 276.
14. Еропкин, М.Ю. Некоторые биохимические показатели цитотоксического ответа фибробластов человека в культуре под действием природных и синтетических поликатионов / М.Ю. Еропкин, Т.Е. Афиногенов, Е.М. Еропкина // *Вопр. мед. химии*. – 1995. – Т. 41, № 2. – С. 36 – 40.
15. Еропкин, М.Ю. Модели, альтернативные использованию лабораторных животных в токсикологии. Достижения и проблемы / М.Ю. Еропкин // *Токсикол. вестник*. – 1999. – № 5. – С. 7 – 13.
16. Еропкин, М.Ю. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов / М.Ю. Еропкин, Е.М. Еропкина. – СПб. : МОРСАР АВ, 2003. – 239 с.
17. Завьялов, Н.В. Ускоренное изучение цитотоксического действия в экспресс-тестах *in vitro* / Н.В. Завьялов, Г.П. Червонская, Г.П. Панкратова и др. // Тезисы докл. 1 съезда токсикологов России. – 1998. – С. 279.
18. Илюхин, В.И. Мелиоидоз: итоги столетнего изучения, современные проблемы и зримые перспективы / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2012. – № 5. – С. 41 – 44.

19. Каркищенко, Н.Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии / Н.Н. Каркищенко // Биомедицина. – 2006. – № 4. – С. 5 – 23.

20. Король, Е.В. Цитотоксическое действие *Burkholderia cepacia* на клетки *Tetrahymena pyriformis* при совместном культивировании / Е.В. Король, Л.К. Меринова, М.О. Нехезина // Вестник ВолгГМУ. – 2014. – № 1 (49). – С. 125 – 127.

21. Культивирование вирусов в культурах клеток: учебно-методическое пособие для студентов специальности «Ветеринарная медицина» / Р.Б. Корочкин, А.А. Вербицкий, В.Н. Алешкевич, А.В. Сандул. – Витебск: ВГАВМ, 2010. – 23 с.

22. Культура животных клеток. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – С. 333.

23. Маркина, О.В. Культуры клеток в изучении биологической активности токсинов *Vibrio cholerae*, продуцируемых рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* / О.В. Маркина, Л.П. Алексеева, Е.В. Монахова // Пробл. комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». – 2006. – № 19. – С. 91 – 93.

24. Маркина, О.В. Изучение токсинопродуцирующей способности штаммов *Vibro cholerae* O1 и *Vibro cholerae* O139 с помощью иммуноферментного анализа и культуры клеток: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07/ Маркина Ольга Владимировна. – Ростов н/Д, 2008. – 139 с.

25. Мауэр, Г. Разработка химически определенных бессывороточных сред для клеток млекопитающих // в кн.: Культура живых клеток. Методы. / Под ред. Фрешни Р. – М.: Мир, 1989. – С. 27 – 55.

26. Методические указания. Аттестация перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов. РД 42-28-10-89. – Москва. – 1989. – 46 с.

27. Методы культивирования клеток: сб. науч. трудов / отв. ред.: Г. П. Пинаев ; АН СССР, Науч. совет по проблемам цитологии, Ин-т цитологии . – Л. : Наука, 1988 . – 313 с.

28. Ободова М.А. Серопротекция и серотерапия синегнойной инфекции в эксперименте: автореф. дис. ...канд. мед. наук: 03.00.07 / Ободова Марина Александровна. – Волгоград, 2007. – 23 с.

29. Онищенко, Г. Г. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза / Г.Г. Онищенко // Вестник Российской Академии Наук : Научный и общественно-политический журнал / гл. ред. Н. А. Платэ.– 2003.– Т.73, №3.

30. Отчёт о НИР (заключит.) / Волгоград. науч.-исслед. противочум. ин-т. – Волгоград, 1997.-№ ГР 01.9.50. 001333 – 73 с.

31. Пат. 2281507 Российская Федерация. Способ оценки токсичности бактериальных антигенов / С.И. Жукова, Ф.К. Адельшин, Н.П. Храпова, Н.Н. Пивень, О.Б. Прошина, А.В. Засядкина, Н.Г. Плеханова; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; заявл. 17.11.2004; опубл. 10.08.2006.

32. Пивень, Н.Н. (Piven N.N.) Immunotropic properties of *Burkholderia pseudomallei* surface and membrane antigens / Н.Н. Пивень, (N.N. Piven), V.S Rybkin, N.G. Plekhanova // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. – 2001. – № 1.– С. 29 – 33.

33. Плеханова, Н.Г. Оценка продукции капсульного гликопротеинового комплекса *Burkholderia pseudomallei* при мелиоидозной инфекции / Н.Г. Плеханова, В.В. Алексеев, Н.Н. Пивень и др. // Пробл. особо опасных инфекций. – 2004. – № 87. – С. 65 – 66.

34. Попов С. Ф. (Popov S. F.) The role of capsule formation in *Burkholderia mallei* for its persistence *in vivo* / S.F. Popov, N.N. Piven, V. I. Kurilov et al. // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. – 2000. – № 3.– С. 73 – 75.

35. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. Волгоград. – 2004. – С. 256.

36. Рожнов, Г.И. Разработка альтернативных методов оценки токсичности химических веществ на основе биотестирования / Г.И. Рожнов, В.А. Проинова, А.В. Лиманцева и др. // Токсикол. вести. – 1995. – № 6. – С. 27 – 29.

37. Романова, С.Г. Синтез, изучение цитотоксических свойств и гемолитической активности катионных глицеролипидов алкильного типа / С.Г.Романова, Г.А. Серебренникова, А.А. Штиль // Вестник МИТХТ.– 2008. – Т.3, №5. – С. 101 – 105.

38. Сальникова, О.И. Чувствительность культуры клеток СНО и ТИФА при тестировании холерного токсина *in vitro* / О.И. Сальникова, Л.П. Алексеева, Л.С. Подосинникова и др. // Пробл. комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». – 1999 – № 12. – С. 83 – 84.

39. Сальникова, О.И. Оценка токсинопродуцирующей активности штаммов холерного вибриона, выделенных при вспышке холеры в Казани в 2001 году, на модели культуры клеток СНО-К1 и ИФА-2АТ / О.И. Сальникова, О.В. Маркина, Б.Л. Мазрухо и др. // Пробл. комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». – 2002 – № 15. – С. 41 – 42.

40. Советова, Г.П. Действие различных доз дифтерийного экзотоксина на свойства клеток L929 и HeLa / Г.П. Советова, А.В. Васильев, В.А. Тутельян и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1980. – №3. – С.57 – 63.

41. Тепкеева, И.И. Пептидные экстракты лекарственных растений: изучение состава и противоопухолевой активности: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.05, 03.00.04 / Тепкеева Инна Ивановна. – М., 2009. – 131 с.

42. Трахтенберг, І.М. Альтернативні методи і тест-системи в сучасній токсикології в кн. «Профілактична токсикологія та медична екологія» Вибрані лекції для науковців, лікарів та студентів / І.М. Трахтенберг, В.М. Коваленко, Н.М. Дмитруха; за загал. редакцією акад. І.М. Трахтенберга. – Київ: ВД «Авіцена», 2011. – 317 с.

43. Фрешни, Р. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Фрешни. – 5-е изд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 714 с.

44. Хэй, Р. Сохранение и оценка качества клеток // в кн.: Культура живых клеток. Методы. / Под ред. Фрешни Р. – М.: Мир, 1989. – С. 108 – 166.
45. Червонская, Г.П. Культура клеток альтернативная биологическая модель в токсикологических исследованиях / Г.П. Червонская // II Тезисы докл. I съезда токсикологов России. – 1998. – С. 328.
46. Aardema, H. Changing epidemiology of melioidosis? A case of acute pulmonary melioidosis with fatal outcome imported from Brazil / H. Aardema, E.M. Luijnenburg, E.F. Salm et al. // *Epidemiol. Infect.* – 2005. – Vol.133. – P. 871 – 875.
47. Anuntagool, N. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vitro growth of virulent Ara- and avirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* / N. Anuntagool, T. Panichakul, P. Aramsri, S. Sirisinha // *Acta trop.* – 2000. – № 74. – P. 221 – 228.
48. Atkins, T. A mutant of *Burkholderia pseudomallei*, auxotrophic in the branched chain amino acid biosynthetic pathway, is attenuated and protective in a murine model of melioidosis / T. Atkins, R.G. Prior, K. Mack et al. // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 5290 – 5294.
49. Attree, O. A second type III secretion system in *Burkholderia pseudomallei*: who is the real culprit? / O. Attree, I. Attree // *Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – P. 3197 – 3199.
50. Auricchio, S. Toxicity mechanisms of wheat and other cereals in celiac disease and related enteropathies / S. Auricchio, G. De Ritis, M. De Vincenzi et al. // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 1985. – Vol. 4. – P. 923 – 930.
51. Barnes, J.L. Development of protective immunity in a murine model of melioidosis is influenced by the source of *Burkholderia pseudomallei* antigens / J.L. Barnes, N. Ketheesan // *Immunol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 85(7). – P. 551 – 557.
52. Barth, A. L. Cystic fibrosis patient with *Burkholderia pseudomallei* infection acquired in Brazil / A. L. Barth, E. de Abreu, F.A. Silva et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 4077 – 4080.

53. Bioterrorism agents/diseases [Electronic resource]. – CDC (Centers for Disease Control and Prevention). – 2015 – Mode access: <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>.

54. Boddey, J.A. The bacterial gene *lfp A* influences the potent induction of calcitonin receptor and osteoclast-related genes in *Burkholderia pseudomallei* induced TRAP-positive multinucleated giant cells / J.A. Boddey, C.J. Day, C.P. Flegg et al. // Cell Microbiol. –2007. – Vol. 9. – P. 514 – 531.

55. Bosshart, H. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin / H. Bosshart, M. Heinzelmann // Ann. N. Y. Acad. Sci. –2007. – Vol. 1096. – P.1 – 17.

56. Breitbach, K. Induction of protective immunity against *Burkholderia pseudomallei* using attenuated mutants with defects in the intracellular life cycle / K. Breitbach, J. Kohler, I. Steinmetz // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2008. – Vol. 102. – P. 89 – 94.

57. Brett, P.J. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains / P.J. Brett, D. Deshazer, D.E. Woods // Epidemiol. Infect. – 1997. – Vol. 118. – P. 137 – 148.

58. Brett, P.J. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species / P.J. Brett, D. Deshazer, D. Woods // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. –Vol. 48. – P. 317 – 320.

59. Brett, P.J. Pathogenesis of and immunity to melioidosis / P. J. Brett, D.E. Woods // Acta. Tropica. – 2000. – Vol. 74. – P. 201 – 210.

60. Brett, P.J. The *wbi A* locus is required for the 2-O-acetylation of lipopolysaccharides expressed by *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* / P.J. Brett, M.N. Burtnick, D.E. Woods // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – Vol. 218. – P. 323 – 328.

61. Browne, R.M. Biological testing of dental restorative materials in vitro—a review / R.M. Browne, M.J. TYAS // J. Oral. Rehabil. – 1979. – Vol. 6(4). – P. 365-374.

62. Burtnick, M.N. Isolation of polymyxin B-susceptible mutants of *Burkholderia pseudomallei* and molecular characterization of genetic loci involved in polymyxin B

resistance / M.N. Burtnick, D.E.Woods // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43. – P. 2648 – 2656.

63. Butler, D. Viral research faces clampdown / D. Butler // *Nature.* – 2012. – Vol. 490. – P. 456.

64. Centre for Infection. Guidelines for action in the event of a deliberate release of glanders and melioidosis. – Health Protection Agency (HPA), UK, 2008. – P. 20.

65. Chaiyaroj, S.C. Differences in genomic macrorestriction patterns of frabinose-positive (*Burkholderia thailandensis*) and Arabinose-negative *Burkholderia pseudomallei* / S.C. Chaiyaroj, K. Kotrnon, S. Koonpaew et al. // *Microbiol. Immunol.* – 1999. – Vol. 43. – P. 625 – 630.

66. Chambón, L. Serological analysis of the somatic antigen of malleomyces pseudomallei II / L. Chambón // *Ann Inst. Pasteur. Paris.* – 1960. – Vol. 98. – P. 405 – 415.

67. Chamson, A. Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell cultures / A. Chamson, J. Frey, M. Hivert // *Toxicol. Environ. Health.* – 1982. – Vol. 9. – P. 921 – 932.

68. Chaowagul, W. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors / W. Chaowagul, Y. Suputtamongkol, D.A.B. Dance et al. // *J. Infect. Dis.* – 1993. – Vol. 168. – P. 1181 – 1185.

69. Cheng, A.C. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management / A.C. Cheng, B.J. Currie // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 18. – P. 383 – 416.

70. Cheng, A.C. A randomized controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of severe sepsis due to melioidosis in Thailand / A.C. Cheng, D. Limmathurotsakul, W. Chierakul et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 45. – P. 308 – 314.

71. Cinelli, S. Alternative methods in toxicology tests: *in vitro* toxicity/ S.Cinelli, A. Falezza, C. Meli et al. // *Cytotechnology.* – 1991. – Vol. 5. – P. 51 – 54.

72. Colling, M. Toxins of *Pseudomonas pseudomallei*. I. Production *in vitro* / M. Colling, C. Nigg, R.J. Heckly // *J. Bacterio.* – 1958. – Vol. 76. – P. 422 – 426.

73. Currie, B.J. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature / B.J. Currie, D.A. Fisher, D.M. Howard et al. // Clin. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 31 (4). – P. 981 – 986.

74. Currie, B.J. Melioidosis: acute and chronic disease, relapse and re-activation / B.J. Currie, D.A. Fisher, N.M. Anstey et al. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2000. – Vol. 94. – P. 301 – 304.

75. Currie, B.J. Neurological melioidosis / B.J. Currie, D.A. Fisher, D.M. Howard et al. // Acta. Tropica. – 2000. – Vol. 74. – P. 145 – 151.

76. Currie, B.J. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update / B.J. Currie, D.A. Dance, A.C. Cheng et al. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2008. – Vol. 102. – P. 1 – 410.

77. Currie, B.J. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: melioidosis and glanders / B.J. Currie // Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone. – 2010. – Vol. 2. – P. 2869 – 7288.

78. Curvall, M. An evaluation of the utility of four *in vitro* short-tel1ttests for predicting the cytotoxicity of individual compounds driven from tobacco smoke / M. Curvall, C.R. Enzell, B. Pettersson // Cell BioI. Toxieol. – 1984. – Vol. 1. – P. 173 – 193.

79. Dannenberg, A.M. Melioidosis: pathogenesis and immunity in mice and hamsters. III. Effect of vaccination with avirulent strains of *Pseudomonas pseudomallei* on the resistance to the establishment and the resistance to the progress of respiratory melioidosis caused by virulent strains; all-or-none aspects of this disease / A.M. Dannenberg, E.M. Scott // J. Immunol. – 1960. – Vol. 84. – P. 233 – 246.

80. DeShazer, D. The type II O-antigenic polysaccharide moiety of *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide is required for serum resistance and virulence / D. DeShazer, P.J. Brett, D.E. Woods // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 30. – P. 1081 – 1100.

81. DeShazer, D. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an

essential virulence determinant / D. DeShazer, D.M. Waag, D.L. Fritz et al. // *Micro. Pathog.* – 2001. – Vol. 30. – P. 253 – 269.

82. Dharakul, T. Phylogenetic analysis of ara⁺ and ara⁻ *Burkholderia pseudomallei* isolates and development of a multiplex PCR procedure for rapid discrimination between the two biotypes / T. Dharakul, B. Tassaneetrithep, S. Trakulsomboon et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37(6) – P. 1906 – 1912.

83. Dorman, S.E. *Burkholderia pseudomallei* infection in a Puerto Rican patient with chronic granulomatous disease: case report and review of occurrences in the Americas / S.E. Dorman, V.J. Gill, J.I. Gallin et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 26. – P. 889 – 894.

84. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers et al. / *Analytical Chemistry*/ – 1956. – Vol. 28. P. 350.

85. Ekwall, B. Screening of toxic compounds in tissue culture / B. Ekwall // *Toxicol.* – 1980. – Vol. 17. – P. 127 – 142.

86. Ekwall, B. Toxicity to HeLa cells of 205 drugs as determined by the metabolic inhibition test supplemented by microscopy / B. Ekwall // *Toxicology.* – 1980. – Vol.17. – P. 273 – 295.

87. Ekwall, B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures / B. Ekwall // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1983. – Vol. 407. – P. 64 – 77.

88. Ekwall, B. Toxicity tests with mammalian cell cultures / B. Ekwall, V. Silano, A. Paganuzzi-Stammati et al. // *Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects.* – 1990. – P. 75 - 98.

89. Ekwall, B. EDIT: a new international multicentre programme to develop and evaluate batteries of *in vitro* tests for acute and chronic systemic toxicity / B. Ekwall, C. Clemedson, C. Ekwall et al. // *ATLA.* – 1999. – Vol. 11. – P. 339 – 349.

90. Fuller, A.T. The foramide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci / A.T. Fuller // *Brit. J. Exp. Pathol.* – 1938. – Vol. 19, № 2. – P. 130 – 139.

91. Galyov, E.E. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis / E.E. Galyov, P.J. Brett, D. DeShazer // Annual Review of Microbiology. – 2010. – Vol. 64. – P. 495 – 517.
92. Garrett, N.E. The utilization of the rabbit alveolar macrophage and chinese hamster ovary cell for evaluation of the toxicity of particulate materials. I. Model compounds and metal-coated fly ash / N.E. Garrett, J.A. Campbell, H.F. Stack et al. // Environ. Res. – 1981. – Vol. 24. – P. 345 – 365.
93. Genshow, E. The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models / E. Genshow, H. Spielmann, G. Scholz et al. // ATLA. – 2002. – Vol. 30. – P. 151 – 176.
94. Gilad, J. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness / J. Gilad, I. Harary, T. Dushnitsky et al. // Isr. Med. Assoc. J. – 2007. – Vol. 9 (7). – P. 499 – 503.
95. Glass, M.B. Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States / M.B. Glass, J.E. Gee, A.G. Steigerwalt et al. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 4601 – 4604.
96. Guerrant, R.L. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* / R.L. Guerrant, L.L. Brunton, T.E. Schnaitman et al. // Infect. Immunity. – 1974. – Vol. 10. – P. 320 – 327.
97. Haase, A. Toxin production by *Burkholderia pseudomallei* strains and correlation with severity of melioidosis / A. Haase, J. Janzen, S. Barrett et al. // J. Med. Microbiol. – 1997. – Vol. 46. – P. 557 – 563.
98. Hampton, V. Melioidosis in birds and *Burkholderia pseudomallei* dispersal, Australia / V. Hampton, M. Kaestli, M. Mayo et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17 (7). – P. 1310 – 1312.
99. Haque, A. A live experimental vaccine against *Burkholderia pseudomallei* elicits CD4+ T cell-mediated immunity, priming T cells specific for 2 type III secretion

system proteins / A. Haque, K. Chu, A. Easton et al. // *J. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 194. – P. 1241 – 1248.

100. Haraga, A. *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated Type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei* / A. Haraga, T.E. West, M.J. Brittnacher et al. // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76. – P. 5402 – 5411.

101. Harland, D.N. Identification of a LolC homologue in *Burkholderia pseudomallei*, a novel protective antigen for melioidosis / D.N. Harland, K. Chu, A. Haque et al. // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75 (8). – P. 4173 – 4180.

102. Harley, V.S. Effects of *Burkholderia pseudomallei* and other *Burkholderia* species on eukaryotic cells in tissue culture / V.S. Harley, D.A.B. Dance, B.S. Drasar et al. // *Microbios.* – 1998. – Vol. 96. – P. 71 – 93.

103. Hartung, T. Good cell culture practice (GCCP) — an initiative for standardization and quality control of in vitro studies. The establishment of an ECVAM Task Force on GCCP / T.Hartung, G.Gstraunthaler, S. Coecke et al. // *ALTEX.* – 2001. – Vol. 18 (1). – P. 75 – 78.

104. Häußler, S. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei* / S. Häußler, M. Nimtz, T. Domke et al. // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66. – P. 1588 – 1593.

105. Heckly, R.J. Toxins of *Pseudomonas pseudomallei* II. Characterization / R.J. Heckly, C. Nigg // *J. Bacteriol.* – 1958. – Vol. 76. – P. 427 – 436.

106. Hensten-Pettersen, A. Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials / A. Hensten-Pettersen, K. Helgeland // *Scand. J. Dent. Res.* – 1981. – Vol. 89. – P. 102 – 107.

107. Hodgson, J.C. Endotoxin and mammalian host responses during experimental disease / J.C. Hodgson // *Journal of Comparative Pathology.* – 2006. – Vol. 135 (4). – P. 157 – 175.

108. Holden, M.T.G. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei* / M.T.G. Holden, R.W. Titball, S.J. Peacock et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 14240 – 14245.

109. Howe, C. The pseudomallei group: a review / C. Howe, A. Sampath, M. Spotnitz // J. Infect. Dis. – 1971. – Vol. 124. – P. 598 – 606.
110. Igietseme, J.U. Antibody regulation of T-cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens / J.U. Igietseme, F.Q. Eko, Q. He et al. // Expert. Rev. Vaccines. – 2004. – Vol. 3 (1). – P. 23 – 34.
111. Ismail, G. A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin / G. Ismail, M.N. Embi, O.Omar et al. // J. Clin. Microbiol. – 1987. – Vol. 23. – P. 353 – 357.
112. Isshiki, Y. Separation of 6-deoxyheptanose from a smooth-type lipopolysaccharide Preparation of *Burkholderia pseudomallei* / Y. Isshiki, M. Matsuura, S. Dejsirilert et al. // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – Vol. 199. – P. 21 – 25.
113. Jones, A.L. Identification and characterization of a two-component regulatory system involved in invasion of eukaryotic cells and heavy-metal resistance in *Burkholderia pseudomallei* / A.L. Jones, D. DeShazer, D.E. Woods // Infect. Immun. – 1997. – Vol. 65(12). – P. 4972 – 4977.
114. Jones, A.L. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* / A.L. Jones, T.J. Beveridge, D.E. Woods // Infect. Immun. 1996. – Vol. 64(3). – P. 782 – 790.
115. Kangas, L. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluation cytotoxicity agents *in vitro* / L. Kangas, M. Gronroos, A.L. Nieminen // Medicin. Biology. – 1984. – Vol. 62. – P. 338 – 343.
116. Karkischenko, N.N. Perspectives of $\alpha 2$ -interferon usage for immunobiological correction of postvaccinal reactions / N.N. Karkischenko, S.U. Pchelintsev, L.A. Denisov // 7th Int.Symp. «Chem. and biol. warfare agents», Stockholm, Sweden. – 2001. – P. 214.
117. Kasten, F.H. A model culture system with human gingival fibroblasts for evaluating the cytotoxicity of dental materials / F.H. Kasten, S.M. Felder, L. Getdeman et al. // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 1982. – Vol.18. – P. 650 – 660.
118. Kespichayawattana, W. Virulent *Burkholderia pseudomallei* is more efficient than avirulent *Burkholderia thailandensis* in invasion of and adherence to cultured

human epithelial cells / W. Kespichayawattana, P. Intachote, P. Utaisincharoen // *Microb. Pathog.* – 2004. – Vol. 36. – P. 287 – 292.

119. Klaassen, E.D. Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment / E.D. Klaassen, N.H. Stacey // *Toxicology of the Liver*, Raven Press, New York. –1982. – P. 147 – 179.

120. Knapp, H.H.G. Morphine injector's septicaemia (Whitmore's disease) / H.H.G. Knapp // *Indian. Med. Gaz.* – 1915. – Vol.50. – P. 287 – 288.

121. Knutson, V.P. Purification of a murine monoclonal antibody of the Ig M class / V.P. Knutson, R.A. Buck, R.M. Moreno // *J. Immunol. Meth.* – 1991. – Vol. 136. – P. 151 – 157.

122. Krishnasawmy, C.S. Morphia injector's septiaemia / C.S. Krishnasawmy // *Indian. Med. Gaz.* – 1917. – Vol. 52. – P. 296 – 299.

123. Lath, R. Brain abscess as the presenting feature of melioidosis / R. Lath, V. Rajshekhar, V. George // *Br. J. Neurosurgery.* – 1998. – Vol. 12. – P. 170 – 172.

124. Le Hello, S. Melioidosis in New Caledonia / S.Le Hello, B.J. Currie, D. Godoy et al. // *Emerging. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1607 – 1609.

125. Leelarasamee, A. Melioidosis: review and update / A. Leelarasamee, S. Bovornkitti // *Rew. Infect. Dis.* – 1989. – Vol. 11. – P. 413 – 425.

126. Leelarasamee, A. Recent development in melioidosis / A. Leelarasamee // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 17. – P. 131 – 136.

127. Leon,C.G. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases / C.G. Leon, R. Tory, J. Jia et al. // *Pharm. Res.* – 2008. – Vol. 25. – P. 1751 – 1761.

128. Levine, H.B. Immunization with an induced avirulent auxotrophic mutant of *Pseudomonas pseudomallei* / H.B. Levine, R.L. Maurer // *J. Immunol.* – 1958. – Vol. 81. – P. 433 – 438.

129. Limmathurotsakul, D. Risk factors for recurrent melioidosis in northeast Thailand / D. Limmathurotsakul, W. Chaowagul, W. Chierakul et al. // *Clin. Infect.Dis.* – 2006. – Vol. 43 (8). – P. 979 – 986.

130. Liu, P.V. Survey of haemolysin production among species of *pseudomonads* / P.V. Liu // J. Bacteriol. – 1957. – Vol. 74. – P. 718 – 727.
131. Lowry, O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent title /O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr et. al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265 – 275.
132. Lundborg, P. Effects of waste incineration combustion emissions measured by some toxicity test systems / P. Lundborg, I. Cederberg, L. Wiklund et al. // Toxicol. Left. – 1983. – Vol. 19. – P. 97 – 107.
133. Martin, J.W. History of biological weapons: from poisoned darts to intentional epidemics. Textbooks of military medicine: medical aspects of biological warfare / J.W. Martin, G.W., Christopher, E.M. Eitzen. – Washington: DC: Borden Institute, 2007. – P. 1 – 20.
134. Masters, J.R. Animal Cell Culture: A Practical Approach / J.R. Masters. – Oxford University Press, 2000. – 315 p.
135. Mays, E.E. Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty-six years following initial geographic exposure / E.E. Mays, E.A. Ricketts // Chest. – 1975. – Vol. 68. – P. 261 – 263.
136. Melioidosis [Electronic resource]. – CDC (Centers for Disease Control and Prevention). – 2012 – Mode access: <http://www.cdc.gov/melioidosis/>.
137. Miller, S.I. LPS, TLR4 and infectious disease diversity / S.I. Miller, R.K. Ernst, M.W. Bader // Nat. Rev. Microbiol. – 2005. – Vol. 3. – P. 36 – 46.
138. Mohamed, R. Inhibition of macromolecular synthesis in cultured macrophages by *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin / R. Mohamed, S. Nathan, N. Embi // Microbiol. Immunol. – 1989. – Vol. 33. – P. 811 – 820.
139. Nelson, M.E. Evaluation of lipopolysaccharide and capsular polysaccharide as subunit vaccines against experimental melioidosis / M.E. Nelson, J.L. Prior, M.S. Leve et al. // J. Med. Microbiol. – 2004. – Vol. 53. – P.1177 – 1182.
140. Ngauy, V. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II / V. Ngauy, Y. Lemeshev, L. Sadkowski et al. // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol.43. – P. 970 – 972.

141. Ngugi, S.A. Lipopolysaccharide from *Burkholderia thailandensis* E264 provides protection in a murine model of melioidosis / S.A. Ngugi, V.V. Ventura, O. Qazi et al. // *Vaccine*. – 2010. – Vol.28 (47). – P. 7551 – 7555.
142. Nierman, W.C. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome / W.C. Nierman, D. DeShazer, H. S. Kim et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 14246 – 1425.
143. Nigg, C. Toxin produced by *malleomyces pseudomallei* / C. Nigg, R.J. Heckly, M. Colling // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1955. – Vol.89. – P. 17 – 20.
144. Niyompanich, S. Source-identifying biomarker ions between environmental and clinical *Burkholderia pseudomallei* using whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) / S. Niyompanich, J. Jaresitthikunchai, K. Srisanga et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(6). – P. 99160.
145. Norris, M.H. The *Burkholderia pseudomallei* δ asd mutant exhibits attenuated intracellular infectivity and imparts protection against acute inhalation melioidosis in mice/ M.H. Norris, K.L. Propst, Y. Kang // *Infect. Immun.* – 2011. – Vol.79. – P. 4010 – 4018.
146. O’Berry, P.A. A comparison of 3 methods of serum fractionation in the preparation of vibrio fetus fluorescent antibody conjugates / P.A. O’Berry// *Am. J. Vet. Res.* – 1964. – Vol. 25. – P. 1669 – 1672.
147. OECD. Draft Test Guidline on Acute Toxicity – Fixed Dose Procedure. – Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2004 – P. 24.
148. OECD. Guidance Document for the Development of OECD GuideLines for Testing of Chemicals: Environmental Monographs. – Paris, OECD, 1995. – P. 28.
149. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. – Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. – P. 14.
150. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure. – Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. – P. 26.

151. Ong, C. Patterns of large-scale genomic variation in virulent and avirulent *Burkholderia* species / C. Ong, C.H. Ooi, D. Wang // *Genome. Res.* – 2004. – Vol.14. – P. 2295 – 2307.
152. Pappas, G. Category B potential bioterrorism agents: bacteria, viruses, toxins, and foodborne and waterborne pathogens / G. Pappas, P. Panagopoulou, L. Christou et al. // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2006. – Vol. 20 (2). – P. 395 – 421.
153. Patel, N. Development of vaccines against *Burkholderia pseudomallei* / N. Patel, L. Conejero, M. De Reynal // *Front. Microbiol.* – 2011. – Vol.2. – P. 198.
154. Perry, M.B. Structural characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Burkholderia pseudomallei* / M.B. Perry, L.L. MacLean, T. Schollaardt // *Infect. Immun.* – 1995. – Vol. 63. – P. 3348 – 3352.
155. Poxton, I. R. Antibodies to lipopolysaccharide / I. R. Poxton // *Journal of Immunological Methods.* – 1995. – Vol. 186 (1). – P.1 – 15.
156. Price, E.P. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* over a twelve-year chronic carriage infection / E.P. Price, D.S. Sarovich, M. Mayo et al. // *MBio.* – 2013. – Vol. 4. – P. 388.
157. Prior, T.I. Studies on the activity of barnase toxins in vitro and *in vivo* / T.I. Prior, S. Kunwar, I. Pastan // *Bioconjug. Chem.* – 1996. – Vol. 7 (1). – P. 23 – 29.
158. Raetz, C.R. Lipopolysaccharide endotoxins / C.R. Raetz, C. Whitfield // *Annual Review of Biochemistry.* – 2002. – Vol. 71 (1). – P. 635 – 700.
159. Rainbow, L. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei* / L. Rainbow, C.A. Hart, C. Winstanley // *J. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol. 51. – P. 374 – 384.
160. Rammaert, B. Pulmonary melioidosis in Cambodia: a prospective study / B. Rammaert, J. Beauté, L. Borand et al. // *BMC Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 11 (1). – P. 126.
161. Reckseidler, S.L. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant / S.L. Reckseidler, D. DeShazer, P. A. Sokol et al. // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 34 – 44.

162. Reckseidler-Zenteno, S.L. The Capsular Polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition / S.L. Reckseidler-Zenteno, R. DeVinney, D.E. Woods // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73. – P. 1106 – 1115.
163. Reckseidler-Zenteno, S.L. Capsular Polysaccharides Produced by the Bacterial Pathogen *Burkholderia pseudomallei* / S.L. Reckseidler-Zenteno. – Athabasca University, Athabasca, Alberta, Canada, 2012. – P. 127 – 152.
164. Redfearn, M. S. A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei* / M.S. Redfearn, N.J. Palleroni, R.Y. Stanier // *J. Gen. Microbiol.* – 1966. – Vol. 43. – P. 293 – 313.
165. Rietschel, E.T. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function / E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schadeet et al. // *FASEBJ.* – 1994. – Vol. 8. – P. 217 – 225.
166. Rietschel, E.T. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification / E.T. Rietschel, H. Brade, O. Holst et al. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2004. – Vol. 216. – P. 39 – 81.
167. Roberts, I.S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria / I.S. Roberts // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1996. – Vol. 50. – P. 285 – 315.
168. Sadeghi-Aliabadi, H. Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells / H. Sadeghi-Aliabadi, M. Minaiyan, A. Dabestan // *Research in Pharmaceutical Sciences.* – 2010. – Vol. 5 (2). – P. 127 – 133.
169. Salam, A. Melioidosis acquired by traveler to Nigeria / A. Salam, N. Khan, H. Malnick et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 17 (7). – P. 1296 – 1298.
170. Sarkar-Tyson, M. Protective efficacy of heat-inactivated *B. thailandensis*, *B. mallei* or *B. pseudomallei* against experimental melioidosis and glanders / M. Sarkar-Tyson, S.J. Smither, S.V. Harding et al. // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27(33). – P. 4447 – 4451.

171. Sarkar-Tyson, M. Progress toward development of vaccines against melioidosis: A review / M. Sarkar-Tyson, R.W. Titball // *Clin. Ther.* – 2010. – Vol. 32 (8). – P. 1437 – 1445.
172. Schaechter, M. Damage by microbial agents / M. Schaechter // *Mechanism of Microbial Disease.* – 1998. – P.115 – 125.
173. Schell, M.A. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei* / M.A. Schell, R.L. Ulrich, W.J. Ribot et al. // *Mol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 64. – P.1466 – 1485.
174. Schlech, W.F. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis) / W.F. Schlech, J.B. Turchik, R.E. Westlake et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1981. – Vol. 305. – P. 1133 – 1135.
175. Schönherr, O.T. Antibody engineering, a strategy for the development of monoclonal antibodies / O.T. Schönherr, E.H. Howink // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1984. – Vol. 50, № 5/6. – P. 597 – 623.
176. Schrattenholz, A. Potential of comprehensive toxico-proteomics: quantitative and differential mining of functional proteoms from native samples / A. Schrattenholz, M. Klemm, M. Cahill // *ATLA.* – 2004. – Vol.32. – P. 123 – 131.
177. Shrivastava, R. Comparison of *in vivo* acute lethal potency and *in vivo* cytotoxicity of 48 chemicals / R. Shrivastava, C. Delomenie, A. Chevalier et al. // *Cell Biology & Toxicology.* – 1992. – Vol. 8. – P. 157 – 170.
178. Simpson, A.J. Comparison of imipenem and ceftazidime as therapy for severe melioidosis / A.J. Simpson, Y. Suputtamongkol, M.D. Smith et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 29(2). – P.381 – 387.
179. Sirisinha, S. Antigenic differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* / S. Sirisinha, N. Anuntagool, P. Intachote, V. Wuthiekanun et al. // *Microbiol. Immunol.* – 1998 – V. 42(11). – P. 731 – 737.
180. Smith, M.D. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei* / M.D. Smith, B.J. Angus, V. Wuthiekanun et al. // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – P. 4319 – 4321.

181. Spielmann, H. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the Up and Down Procedure (UDP) from cytotoxicity data / H. Spielmann, E. Genshow, M. Liebbsch et al. // ATLA. – 1999. – Vol. 27. – P. 957 – 966.
182. Sprague, L.D. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation / L.D. Sprague, H. Neubauer // J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health. – 2004. – Vol.51 (7). – P. 305 – 320.
183. Srilunchang, T. Construction and characterization of an unmarked aroC deletion mutant of *Burkholderia pseudomallei* strain A2 / T. Srilunchang, T. Prongvitaya, S. Wongratanacheewin et al. // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 2009. – Vol.40. – P. 123 – 130.
184. Stanton, A.T. Melioidosis, a new disease of the tropics / A.T. Stanton, W. Fletcher // Trans 4th Congress Far East Assoc. Trop. Med. – 1921. – Vol. 2. – P. 196 – 198.
185. Steinmetz, I. Purification and characterisation of an exopolysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* / I. Steinmetz, M. Rohde, B. Brenneke // Infect Immun. – 1995. – № 63. – P. 3959 – 3965.
186. Steinmetz, I. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody / I. Steinmetz, A. Reganzerowski, B. Brenneke, S. Haussler et al. // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37(1). – P. 225 – 228.
187. Stevens, J.M. Actin-binding proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia pseudomallei* bim A mutant / J.M. Stevens, R.L. Ulrich, L.A. Taylor et al. // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187. – P. 7857 – 7862.
188. Stevens, M.P. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen / M.P. Stevens, M.W. Wood, L.A. Taylor et al. // Mol. Microbiol. – 2002. – Vol. 46. – P. 649 – 659.
189. Stevens, M.P. Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type III secretion mutant in murine models of melioidosis / M.P.

Stevens, A. Haque, T. Atkins et al. // *Microbiology*. – 2004. – Vol. 150. – P. 2669 – 2676.

190. Stone, J.K. Detection of *Burkholderia pseudomallei* O-antigen serotypes in near-neighbor species / J.K. Stone, M. Mayo, S.A. Grasso et al. // *BMC Microbiology*. – 2012. – Vol. 12(1). – P. 250.

191. Stone, R. Infectious disease. Racing to defuse a bacterial time bomb / R. Stone // *Science*. – 2007. – Vol. 317. – P. 1022 – 1024.

192. Thibault, F.M. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes / F.M. Thibault, E. Valade, D.R. Vidal // *J. Clin. Microbiol.* – 2004.– Vol. 42.– P. 5871 – 5874.

193. Tuanyok, A. The genetic and molecular basis of O-antigenic diversity in *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide /A. Tuanyok, J.K. Stone, M. Mayo et al. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2012. – Vol. 6(1). – P. 1453.

194. USAMRIID (US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases). USAMRIID's medical management of biological casualties handbook. Ed 7. Fort Detrick Frederick, MD: USAMRIID, 2011.

195. Vasu, C. The humoral immune response in melioidosis patients during therapy / C. Vasu, J.Vadivelu, S.D. Puthuchery // *Infection*. – 2003. – Vol. 31.– P. 24 – 30.

196. Vidyalakshmi, K. Melioidosis: an under-diagnosed entity in western coastal India: a clinico-microbiological analysis / K. Vidyalakshmi, B. Shrikala, B. Bharathi et al. // *Indian. J. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 245 – 248.

197. Vietri, N.J. Melioidosis. Textbooks of military medicine: medical aspects of biological warfare / N.J. Vietri, D. Deshazer; In: Dembek Z.F., – Washington, DC: Borden Institute, 2007 – P. 121 – 146.

198. Wakuri, S. Cytotoxicity study of 32 MEIC Chemicals by colony formation and ATP assays / S. Wakuri, J.Izumi, K. Sasaki et al. // *Toxicol.in vitro*. – 1993. – Vol.7. – P. 517 – 521.

199. Warawa, J. Type III secretion system cluster 3 is required for maximal virulence of *Burkholderia pseudomallei* in a hamster infection model / J. Warawa, D.E. Woods // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – Vol. 242. – P. 101 – 108.
200. White, N.J. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazadime / N.J. White, D.A. Dance, W. Chaowagu et al. // Lancet. – 1989. – Vol. 2. – P.697 – 701.
201. White, N.J. Melioidosis / N.J.White // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 1715 – 1722.
202. WHO (World Health Organization). Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance. Ed 2. Annex 3 Biological agents. 2004. – P. 246 – 250.
203. Wiersinga, W.J. Melioidosis / W.J. Wiersinga, B.J. Currie, S.J. Peacock // N. Engl. J. Med. – 2012. – Vol. 367. – P.1035 – 1044.
204. Wikraiphat, C. Comparative *in vivo* and *in vitro* analyses of putative virulence factors of *Burkholderia pseudomallei* using lipopolysaccharide, capsule and flagellin mutants / C. Wikraiphat, J. Charoensap, P. Utaisincharoen et al. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 56. – P.253 – 259.
205. Wilson, J.W. Mechanisms of bacterial pathogenicity / J.W. Wilson, M.J. Schurr, C.L. LeBlanc et al. // Postgrad. Med. J. – 2002. – Vol. 78 (918). – P. 216 – 224.
206. Woods, D.E. The use of animal infection models to study the pathogenesis of melioidosis and glanders / D.E. Woods // Trends. Microbiol. – 2002. – Vol.10. – P. 483 – 484.
207. Woods, M.L. Neurological melioidosis: seven cases from the Northern Territory of Australia / M.L. Woods, B.J. Currie, D.M. Howard // Clin. Infect. Dis. – 1992. – Vol.15. – P. 163 – 169.
208. Yabuuchi, E. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) / E. Yabuuchi, Y.Kosako, H. Oyaizu et al. // Microbiol. Immunol. – 1992. – Vol. 36. – P. 1251 – 1275.
209. Yang, S. Melioidosis research in China / S. Yang // Acta. Trop. – 2000. – Vol. 77. – P. 157 – 165.

210. Yu, Y. Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis* / Y. Yu, H.S. Kim, H.H. Chua et al. // BMC Microbiol. – 2006. – Vol. 6. – P. 46 – 62.

211. Zamora, P.O. Cytotoxicity and mutagenicity of vapor-phase pollutants in rat lung epithelial cells and Chinese hamster ovary cells grown on collagen gels / P.O. Zamora, J.M. Benson, T.C. Marshall et al. // J. Toxicol. environ. Health. – 1983. – Vol. 12. – P. 27 – 38.