

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116

УДК 616.932:615.371

О.С. Дуракова, О.В. Громова, А.В. Гаева, С.В. Генералов, Л.Ф. Ливанова, О.Д. Клокова, О.А. Волох

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК CHO-K1 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

ФКВЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель – экспериментально обосновать возможность использования перевиваемой линии клеток CHO-K1 для определения специфической активности холерного токсина и компонента вакцины холерогена-анатоксина в процессе производства холерной химической вакцины. **Материалы и методы.** В исследованиях использовали перевиваемую линию клеток CHO-K. Учет результатов метода биоиндикации на перевиваемой клеточной линии проводили визуально с помощью инвертированного микроскопа и фотометрически в колориметрическом тесте для оценки метаболической активности клеток при длине волны 595 нм. **Результаты и обсуждение.** Предлагаемый метод позволяет определить активность продукции токсина у штамма *Vibrio cholerae* 569B при глубинном культивировании в биореакторе и специфическую активность холерогена-анатоксина по анатоксиносвязыванию с использованием клеточных культур. Результаты коррелируют с данными, полученными при использовании методов внутрикожной пробы по Крейгу, GM₁-ИФА и РПИГ. Введение в практику метода клеточных культур может обеспечить существенное сокращение использования животных на этапах производства вакцины холерной бивалентной химической.

Ключевые слова: холерная химическая вакцина, культура клеток CHO-K1, холерный токсин, холероген-анатоксин.

Корреспондирующий автор: Дуракова Оксана Сергеевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А. Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток CHO-K1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:113–116. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116

O.S. Durakova, O.V. Gromova, A.V. Gaeva, S.V. Generalov, L.F. Livanova, O.D. Klokhova, O.A. Volokh

Experimental Substantiation of the Possibility to Use Finite Cell Line CHO-K1 for Determination of Specific Activity of Components of Chemical Cholera Vaccine

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Objective was to experimentally substantiate the possibility to use the finite cell line CHO-K1 for measuring specific activity of cholera toxin and component of the vaccine cholera-anatoxin in the process of chemical cholera vaccine manufacturing. **Materials and methods.** The studies involved the finite cell line CHO-K. The registration of results of bio-indication method was performed visually with the help of inverted microscope and photometrically – in colorimetric test for the assessment of metabolic activity of the cells at the wave length of 595 nm. **Results and discussion.** The proposed method allows for determining the toxin-production activity of *Vibrio cholerae* 569B strain during submerged cultivation in bioreactor and specific activity of cholera-anatoxin by anatoxin binding measuring using cell cultures. The results correlate with the data obtained using intra-dermal Craig's technique, GM₁-ELISA and radial passive immune hemolysis (RPIH). Introduction of cell culture method into practice will provide for significant decrease in the volumes of usage of animals at the stages of manufacturing of chemical bivalent cholera vaccine.

Key words: chemical cholera vaccine, cell culture CHO-K1, cholera toxin, cholera-anatoxin.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Oksana S. Durakova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Durakova O.S., Gromova O.V., Gaeva A.V., Generalov S.V., Livanova L.F., Klokhova O.D., Volokh O.A. Experimental Substantiation of the Possibility to Use Finite Cell Line CHO-K1 for Determination of Specific Activity of Components of Chemical Cholera Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2019; 4:113–116. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116

Received 09.08.19. *Revised* 13.11.19. *Accepted* 27.11.19.

Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и зарегистрированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава. Актуальным вопросом производства вакцин остается совершенствование методов контроля активных компонентов.

В настоящее время для контроля специфической активности на этапах производства холерной вакци-

ны используют лабораторных животных [1]. В то же время в литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности применения альтернативных методов, основанных на использовании перевиваемых клеточных культур для оценки активности холерного токсина. Данные методы высокочувствительны и воспроизводимы, так как в работе используются стандартные среды и референтные линии клеток. Установлено,

что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [2].

В связи с вышеизложенным замена методов определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины на биомоделях на этапах ее производства на высокочувствительные, воспроизводимые и простые в постановке методы *in vitro* является актуальной задачей и определяет необходимость их внедрения в производственный процесс.

Цель работы – экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток СНО-К1 для определения специфической активности холерного токсина и компонента вакцины холерогена-анатоксина в процессе производства холерной химической вакцины.

Материалы и методы

В работе использованы образцы фильтрата бульонной культуры *V. cholerae* 569В, компоненты вакцины (холероген-анатоксины), и, в качестве положительного контроля, препарат холерного токсина (ХТ). Подготовку образцов культуральной жидкости, содержащих ХТ, проводили согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

В качестве биомodelей использовали клинические здоровых взрослых кроликов породы шиншилла со светлой кожей и массой (2,75±0,25) кг. Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным биоэтической комиссией института «Микроб», в условиях вивария ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с уровнем биологической безопасности BSL 3.

Концентрацию белка в исследуемых образцах определяли по Лоури. Концентрация белка в препарате ХТ составила 30 мкг/лунку, а в препаратах холерогена-анатоксина 57 мкг/лунку.

Перевиваемая линия клеток СНО-К1 получена из Коллекции культур клеток позвоночных ИИЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки культуры СНО-К1 выращивали в среде Игла и 199 (1:1) с добавлением 5 % сыворотки КРС по общепринятой методике с соблюдением условий асептики. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С с содержанием 5 % CO₂. Через 18–20 ч заменяли питательную среду по 100 мкл без сыворотки.

Определение активности ХТ на линии клеток СНО-К1 проводили по следующей схеме: в первые лунки каждого ряда вносили исследуемые образцы фильтрата бульонной культуры, разведенные 1:10 в питательной среде, по 100 мкл; далее образцы титровали до конца ряда по 100 мкл, получая двукратные разведения с конечным объемом 100 мкл.

Для подтверждения специфичности действия образца на клеточную культуру ставили контроль специфичности, для этого исследуемый образец добавляли к антихолерогенной сыворотке с ранее

установленным титром в соотношении 1:1; смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Планшет закрывали и помещали в CO₂-инкубатор при 37 °С и 5 % CO₂. Через 18 ч проводили морфологическое изучение культур с помощью инвертированного микроскопа «Биомед 3».

Учет реакции с опытными образцами осуществляли в системе контролей: контроль клеток в среде культивирования (отрицательный контроль), контроль активности стандартного препарата ХТ (положительный контроль), контроль нейтрализации действия контрольного препарата (контроль специфичности). Активность ХТ оценивали путем подсчета процента содержания измененных и типичных клеток в лунке. Произвольно выбирали три поля зрения по 100 клеток. За токсическую концентрацию принимали ту концентрацию токсина, которая вызывает специфические изменения у 50 % наблюдаемых клеток: удлинение, деформация, появление разветвленных отростков. Активность ХТ выражают либо в мкг/лунка, либо в титрах.

Активность ХТ штамма *V. cholerae* 569В определяли также биологическим методом – внутрикожной пробой по Крейгу [3] на кроликах и иммунохимическими методами: иммуноферментным анализом с использованием GM₁-ганглиозидов (GM₁-ИФА) и радиальным пассивным иммунным гемолизом (РПИГ). Постановку GM₁-ИФА и РПИГ проводили по стандартным методикам [4, 5]. В работе использовали GM₁-ганглиозиды (Sigma), в качестве субстрата ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Результаты реакции регистрировали на фотометре iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм.

Подготовку образцов холерогена-анатоксина для определения специфической активности по ЕС проводили по стандартной методике [6]. В качестве антитоксического агента использовали антихолерогенную сыворотку. Исследуемые образцы после пробоподготовки вводили внутрикожно одновременно двум кроликам по 0,1 мл каждого разведения, начиная с 2 АЕ. Те же образцы вносили в лунки культурального планшета по 0,1 мл на сформированный монослой. На кроликах и культуре клеток учет проводили через 24 ч. За положительную реакцию в опытных рядах на животных принимали зону отека от 5 до 10 мм, а на культуре клеток за токсическую концентрацию принимали то количество токсина, которое вызывает специфические изменения у 50 % наблюдаемых клеток.

Для учета результатов также применяли колориметрический тест оценки метаболической активности клеток (МТТ), основанный на способности мембранных дегидрогеназ восстанавливать тетразолиевый краситель (ТК) (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) до синего формазана. После 24 ч инкубации клеток с исследуемыми образцами во все лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл ТК в забуференном физиоло-

гическом растворе (5 мг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4 ч при температуре 37 °С, затем содержимое лунок растворяли добавлением 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксида). Оптическую плотность полученного лизата измеряли при длине волны 595 нм на фотометре iMark. Повреждающий эффект (%) рассчитывали по формуле $(OD_{595ab}/OD_{595контроль}) \cdot 100$ [7].

Статистическую обработку результатов проводили, рассчитывая среднее арифметическое значение (M), среднее квадратичное отклонение (s_x) и стандартную ошибку среднего (m_M). Коэффициент корреляции рассчитывали по Пирсону [8].

Результаты и обсуждение

Перевиваемая линия клеток СНО-К1, согласно литературным данным, является наиболее чувствительной линией в отношении ХТ и позволяет выявлять до 20–30 пг/мл вещества [9, 10]. ИФА с использованием GM_1 -ганглиозидов является наиболее чувствительным иммуноферментным методом детекции ХТ, так как обладает сродством к его иммуногенной В-субъединице [5]. В связи с этим данная линия клеток и вариант GM_1 -ИФА использовались нами для определения специфической активности ХТ на этапах производства активного компонента вакцины – холерогена-анатоксина, который получают путем осаждения из безмикробного центрифугата формализированной бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В. В результате формоловой детоксикации ХТ переходит в холероген-анатоксин. Содержание ХТ в бульонной культуре производственного штамма является показателем качества препарата, по которому оценивают возможность дальнейшего проведения производственного цикла.

Контроль содержания ХТ на этапе получения бульонной культуры проводили на культуре клеток СНО-К1 и методом GM_1 -ИФА, а также, согласно нормативной документации, постановкой внутрикожной пробы по Крейгу и в РПИГ. Исследовано 12 образцов фильтратов бульонной культуры. В среднем значения реципрокных титров по всем трем методам составили, соответственно, по Крейгу (128000±395), в РПИГ – (128±11), ИФА – (160±22), на модели культуры клеток – (1280±101). Минимальные значения в реакции по методу Крейга – (2000±51), РПИГ – (8±2), ИФА – (8±2), модели клеточной линии – (160±11). Результаты определения активности ХТ штамма *V. cholerae* 569В с помощью культуры клеток имели положительную корреляцию с данными о токсигенности, полученными при использовании методов внутрикожной пробы по Крейгу, РПИГ и ИФА, при оценке результатов исследования ХТ этими методами коэффициенты корреляции по Пирсону составили 0,8, 0,7, 0,8 соответственно.

Учет результатов метода биоиндикации на перевиваемой клеточной линии проводили также в тесте МТТ. Установлено, что количество живых клеток в

лунках планшета оказалось обратно пропорционально содержанию ХТ в них. В частности, при концентрации белка 15 мкг отмечалось (13±1) % живых клеток, а при 3,75 мкг их количество возрастало до (82±1) %, что соответствовало данным, полученным при визуальном учете морфологических изменений с помощью инвертированного микроскопа.

Предлагаемый метод перевиваемой линии клеток позволяет без использования животных определять присутствие ХТ и уровень его специфической активности в фильтратах бульонной культуры при производстве вакцины холерной бивалентной химической.

Следующим этапом работы являлось определение специфической активности холерогена-анатоксина на культуре клеток параллельно со стандартным методом постановки реакции нейтрализации на животных. Классический метод реакции нейтрализации ХТ, проводимый на животных, является трудоемким, сложным в постановке и дорогостоящим.

При анализе полученных результатов выявлено, что значения показателей специфической активности сопоставимы: в среднем обратные титры составили (5000±302) для реакции нейтрализации на кроликах и (6000±605) для метода биоиндикации. Результаты определения антигенной активности специфической фракции холерогена-анатоксина с помощью реакции анатоксиносвязывания на культуре клеток СНО-К1 имели положительную корреляцию с данными, полученными при использовании регламентного метода нейтрализации, коэффициент корреляции Пирсона составил 0,8.

Введение в практику метода клеточных культур может обеспечить существенное сокращение использования животных при решении вопросов, касающихся количественной оценки биологической активности компонентов холерной вакцины.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
2. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 1:152–7.
3. Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of *V. cholera*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5. PMID: 5922548. PMID: PMC276327.
4. Шагинян И.А., Маракуша Б.М. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термоллабильных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1983; 2:92–6.
5. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*. 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание. Москва; 2015. Т. 1–3.
7. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability

by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018; 6. DOI: 10.1101/pdb.prot095505.

8. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высш. шк.; 1990. 352 с.

9. Guerrant R.L., Brunton L.L., Schaitman T.C., Rebhun L.I., Cilman A.C. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1974; 10(2):320–7. PMID: 4368545. PMCID: PMC414999.

10. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М: Бином. Лаб. Знаний; 2010. 714 с.

References

1. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kuttyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Relevant issues of epidemiological surveillance, laboratory diagnosis and prophylaxis of cholera in the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.

2. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Volokh O.A. [Modern approaches to the control of active agents of chemical cholera vaccine]. *Razrabotka i Registratsiya Lekarnykh Sredstv* [Development and Registration of Pharmaceuticals]. 2018; 1:152–7.

3. Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of *V. cholera*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5. PMID: 5922548. PMCID: PMC276327.

4. Shaginyan I.A., Marakusha B.M. [Modification of the method of passive immune hemolysis on solid nutrient medium for measuring the production of thermo labile enterotoxins by the strains of cholera vibrios and colibacillus]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]. 1983; 2:92–6.

5. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay

A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.

6. State Pharmacopeia of the Russian Federation, 13th edition. Moscow; 2015. Vol. 1–3.

7. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018; 6. DOI: 10.1101/pdb.prot095505.

8. Lakin G.F. [Biometry: Textbook for biology students of specialized higher educational institutions]. Moscow; 1990. 352 p.

9. Guerrant R.L., Brunton L.L., Schaitman T.C., Rebhun L.I., Cilman A.C. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1974; 10(2):320–7. PMID: 4368545. PMCID: PMC414999.

10. Freshni R.Ya. [Animal cell culture: Practice Guidelines]. Moscow; 2010. 714 p.

Authors:

Durakova O.S., Gromova O.V., Gaeva A.V., Generalov S.V., Livanova L.F., Klokova O.D., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 09.08.19.

Отправлена на доработку 05.11.19.

Принята к публ. 27.11.19.