

4. Svensson O., Lindh L., Cardenas M., Arnebrant T. Layer-by-layer assembly of mucin and chitosan – influence of surface properties, concentration and type of mucin. *Journal Colloid Interface Science*, 2006, vol. 299, pp. 608–616.
5. Svensson O., Arnebrant T. Mucin layers and multilayers – physicochemical properties and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010, vol. 15, pp. 395–405.
6. Ahn J., Crouzier T., Ribbeck K., Rubher M.F., Cohen R.E. Turning the properties of mucin via layer-by-layer assembly. *Biomacromol.*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 228–235.
7. Lindh L., Svendsen I. E., Svensson O., Cárdenas M., Arnebrant T. The salivary mucin MUC5B and lactoperoxidase can be used for layer-by-layer film formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, vol. 310, pp. 74–82.
8. Shi L., Caldwell K.D. Mucin Adsorption to Hydrophobic Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000, vol. 224, pp. 372–381.
9. Yamasaki T., Chijiwa K., Endo M. Isolation of mucin from human hepatic bile and its induced effects on precipitation of cholesterol and calcium carbonate in vivo. *Digestive Diseases and Sciences*, 1993, vol. 38, no. 5, pp. 909–915.
10. Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating. *Biomacromol.*, 2004, vol. 5, no. 5, pp. 1962–1972.
11. Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D. Protein loading into porous CaCO₃ microspheres: adsorption equilibrium and bioactivity retention. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, vol. 17, pp. 2523–2530.
12. Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D.V. Protein-containing multilayer capsules by templating on mesoporous CaCO₃ particles: post- and pre-loading approaches. *Macromol. Bioscience*, 2016, vol. 16, pp. 95–105.
13. Балабушевич Н.Г., Зими́на Е.П., Ларионова Н.И. Включение каталазы в полиэлектролитные микросферы из меламинформальдегида, декстрансульфата и протамина. *Биохимия*, 2004, т. 69, № 7, с. 937–944. [Balabushevich N.G., Zimina E.P., Larionova N.I. Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine. *Biochemistry (Mosc.)*, 2004, vol. 69, no. 7, pp. 763–769. (In Russ.)]
14. Mantle M., Allen A. A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain. *Biochem. Soc. Trans.*, 1978, vol. 6, pp. 607–609.
15. Балабушевич Н.Г., Печенкин М.А., Зоров И.Н., Шибанова Е.Д., Ларионова Н.И. Мукоадгезивные полиэлектролитные микрочастицы, содержащие рекомбинантный инсулин человека и его аналоги аспарт и лизпро. *Биохимия*, 2011, т. 76, № 3, с. 400–405. [Balabushevich N.G., Pechenkin M.A., Zorov I.N., Shibanova E.D., Larionova N.I. Mucoadhesive polyelectrolyte microparticles containing recombinant human insulin and its analogs aspart and lispro. *Biochemistry (Mosc.)*, 2011, vol. 76, no. 3, pp. 327–331. (In Russ.)]

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ В ЛИОФИЛИЗОВАННОЙ БЦЖ ВАКЦИНЕ

Угарова Н.Н.^{1,2}, Ломакина Г.Ю.^{1,2}, Черников С.В.³, Винокурова Н.В.³,
Отрашевская Е.В.³, Перевышина Т.А.³, Горбачев В.Ю.³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр. 3, г. Москва, 119991, РФ

² ООО «Люмтек»

Воробьевы горы, 1, стр. 77, г. Москва, 119992, РФ

³ ФГУП "НПО "Микроген" Минздрава России
2-й Волконский пер., д. 10, г. Москва, 127473, РФ

e-mail: nugarova@gmail.com

Аннотация. Модифицирован и оптимизирован метод определения жизнеспособности клеток в лиофилизованной БЦЖ вакцине путем измерения содержания внутриклеточного АТФ. Содержание АТФ определяли биолюминесцентным методом с использованием АТФ-реагента (люциферин/люциферазы). По сравнению с АТФ-методом, опубликованным ранее, мы изменили условия реконструкции и предварительной инкубации лиофилизованной БЦЖ вакцины, а также условия экстракции внутриклеточного АТФ. Это позволило сократить длительность анализа с 36 до 2-х часов, упростить процедуру анализа и сделать ее более пригодной для практического применения. Наблюдалась высокая корреляция между содержанием АТФ и величиной КОЕ, определенной стандартным методом посевов.

Ключевые слова: биолюминесценция, АТФ-метод, жизнеспособность клеток, лиофилизованная БЦЖ вакцина.

BIOLUMINESCENT METHOD FOR RAPID ESTIMATION OF VIABLE MICOBACTERIA IN LYOPHILISED BCG VACCINE

Ugarova N.N.^{1,2}, Lomakina G.Yu.^{1,2}, Chernikov S.V.³, Vinokurova N.V.³,
Otrashevskaya E.V.³, Perevyshina T. A.³, Gorbachev V. Y.³

¹Lomonosov Moscow State University

Lenin hills, 1, bld. 3, 119991, Moscow, Russia

²LLC «Lumtek»

Vorobievsky hills, 1, bld. 77, 119992, Moscow, Russia

³FSUC «SIC «Microgen» MOH RF

2-nd Volkonsky lane, 10, 127473, Moscow, Russia

e-mail:nugarova@gmail.com

Abstract. An assay for quantifying viability in lyophilized BCG vaccine by determining intracellular ATP content was modified and optimized. ATP content was assayed by measuring bioluminescence signal in the presence of ATP-reagent (luciferin/luciferase). In comparison with the ATP-method published before, we changed conditions of lyophilized BCG reconstitution and pre-incubation, as well as that of the ATP extraction. It permitted to decrease the duration of the assay procedure from 36 to 2 hours and to make the assay more simple and suitable for practical application. A high correlation between ATP content and the viable count (CFU) was found.

Key words: bioluminescence, ATP assay, cell viability, lyophilised BCG vaccine.

Вакцина на основе ослабленного штамма живых лиофилизированных бактерий *Mycobacterium bovis* (БЦЖ-вакцина) широко используется во всем мире для вакцинации против туберкулеза и как иммуно-терапевтический агент против рака мочевого пузыря. Каждый год сотни миллионов доз вакцины выпускаются в различных странах мира. Одной из ключевых характеристик БЦЖ-вакцины является специфическая активность (жизнеспособность) лиофилизированных бактерий *M. bovis* BCG, которая характеризуется количеством колониеобразующих единиц в расчете на 1 мл суспензии вакцины (КОЕ/мл) или на 1 мг биомассы (КОЕ/мг). Для этого используют метод посева разведений вакцины на плотную питательную среду и далее клетки инкубируют до тех пор, пока не образуются видимые глазом колонии. Клетки микобактерий растут очень медленно, поэтому длительность инкубации составляет 3-5 недель, после чего становится возможным завершение испытаний образцов вакцины. Кроме того, КОЕ-тест очень вариабелен и часто плохо воспроизводим не только из-за трудностей, связанных с культивированием микобактерий и сложным составом используемой для их роста питательной среды, но и из-за склонности этих организмов к слипанию и агрегации.

В последнее десятилетие получил распространение и одобрение Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) альтернативный метод быстрого определения жизнеспособности клеток в БЦЖ-вакцине, основанный на биоломинесцентном измерении внутриклеточного аденозин-5'-трифосфата (АТФ). Метод позволяет измерять количество внутриклеточного АТФ в короткие сроки. За счет сокращения времени анализа данный метод позволяет существенно упростить процедуру определения специфической активности готового препарата, а также проводить контроль специфической активности полупродукта на разных этапах производственного цикла. Содержание внутриклеточного АТФ является основным индикатором жизнеспособности клеток. При гибели клеток в первую очередь прекращается синтез АТФ, в то время как гидролиз АТФ может некоторое время продолжаться, поэтому содержание внутриклеточного АТФ быстро падает вплоть до нулевых значений. Таким образом, уровень внутриклеточного АТФ является показателем метаболического статуса клеток и варьирует в зависимости от природы и размера клеток, от условий содержания культуры и прочих внешних и внутренних факторов.

Биоломинесцентный метод определения АТФ основан на способности фермента светляковой люциферазы катализировать реакцию окисления субстрата, D-люциферина, в присутствии ионов магния, O₂ и АТФ до оксилуциферина с выделением кванта света. Интенсивность свечения при фиксированном содержании основных компонентов реакционной смеси – люциферазы, D-люциферина и соли магния, пропорциональна содержанию АТФ в анализируемом образце. Таким образом, измеряя концентрацию внутриклеточного АТФ, можно оценить содержание жизнеспособных клеток в образце [1]. Начиная с 1970-х годов, биоломинесцентный метод используется в научных исследованиях для определения активности БЦЖ клеток и изучения их свойств. Наличие корреляция между концентрацией внутриклеточного АТФ и числом жизнеспособных клеток было показано для различных препаратов микобактерий [2].

Производство бактериальных вакцин основано на использовании живых культур микроорганизмов. Длительное сохранение жизнеспособности вакцинного штамма требует определенных условий и достигается несколькими способами: периодическим рекультивированием в случае стабильных штаммов, хранением в глубоко замороженном или лиофилизованном состоянии. Последний метод позволяет продолжительное время сохранять почти без изменений все свойства биопрепарата или продуцента, не требует больших экономических затрат при изготовлении и хранении. Лиофилизация бактериальных культур – сложный технологический процесс. Лиофилизация является сильным стрессовым воздействием на живые клетки. При лиофилизации живые клетки дегидратируются, следствием этого является уменьшение содержания внутриклеточного АТФ. Поэтому перед измерением АТФ клетки регидратируют и реактивируют. Условия реактивации имеют важное

значение для правильного определения содержания внутриклеточного АТФ. При замораживании и лиофилизации часть клеток разрушается, и внутриклеточный АТФ переходит во внеклеточное пространство. Поэтому общее содержание АТФ в анализируемом образце может заметно превышать содержание внутриклеточного АТФ, уровень которого и характеризует жизнеспособность клеток вакцины. Все это показывает, что разработка и оптимизация метода пробоподготовки лиофилизованной вакцины имеет важное значение для правильного определения жизнеспособности клеток вакцины по содержанию внутриклеточного АТФ.

В 2008 г. появилась публикация, посвященная разработке и валидации АТФ-метода для быстрой оценки жизнеспособности препаратов лиофилизованной БЦЖ вакцины [3]. Согласно данной работе ключевой стадией, которая обеспечивала достижение хорошей корреляции между содержанием внутриклеточного АТФ и КОЕ/мг является предварительная инкубация реконструированной вакцины в питательной среде в течение 24 ч при 37 °С. За это время рост клеток еще не начинается, но восстанавливается их метаболическая активность, и возрастает содержание внутриклеточного АТФ. Экстрагировали внутриклеточный АТФ путем нагревания суспензии вакцины в буферном растворе, содержащем лизирующие добавки, и затем измеряли сигнал биолюминесценции в полученном экстракте с использованием биолюминесцентного реагента на основе люциферин-люциферазной системы. Содержание жизнеспособных клеток в вакцине рассчитывали по построенному ранее уравнению корреляционной зависимости между содержанием внутриклеточного АТФ и величиной КОЕ/мг, определенной методом посева. Разработанная методика позволила сократить общую длительность анализа до 36 часов. В ходе валидации метода авторы показали, что предложенный метод характеризуется хорошей воспроизводимостью, правильностью, линейностью, высокой чувствительностью, устойчивостью к небольшим вариациям условий эксперимента. Была получена высокая степень корреляция биолюминесцентного метода с классическим микробиологическим методом посевов. Согласно выводу авторов полученное соотношение между содержанием внутриклеточного АТФ и КОЕ/мг может быть использовано на практике для характеристики специфической активности лиофилизованной БЦЖ вакцины. По инициативе ВОЗ были проведены испытания разработанного метода в шести лабораториях различных стран, чтобы оценить воспроизводимость, пригодность и устойчивость данного биолюминесцентного метода для практического использования. Однако только для трех лабораторий были получены совпадающие результаты, поскольку условия, методики тестирования, реагентная база и оборудование в различных лабораториях несколько различались [4].

Следует отметить, что разработанный АТФ-метод имеет ряд недостатков: длительная инкубация в труднодоступной питательной среде сложного состава, экстракция АТФ из клеток вакцины путем инкубирования пробы образца в горячем буферном растворе, содержащем лизирующие добавки, сложная методика расчета содержания внутриклеточного АТФ с использованием предварительно построенной калибровочной зависимости. Все это, конечно, затрудняло практическое использование данного АТФ-метода.

Целью данной работы была модификация и оптимизация биолюминесцентного метода контроля жизнеспособности лиофилизованной БЦЖ вакцины, что позволило сократить длительность анализа с 36 до 2-х часов, упростить отдельные процедуры, стандартизировать состав реагентов, используемых в анализе. В результате проделанной работы был предложен быстрый, простой и экономичный АТФ-метод контроля специфической активности лиофилизованной БЦЖ вакцины. При этом сохранялась высокая корреляция между содержанием АТФ и КОЕ на 1 мг биомассы микобактерий.

Материалы и методы. Использовали набор реактивов фирмы Люмтек (Россия), который включает шесть герметично закрытых флаконов: три флакона с лиофилизованными биопрепаратами (АТФ-реагент, АТФ-контроль и апиразу) и три флакона с жидкими стерильными препаратами (деионизированная вода, физраствор и диметилсульфоксид). Подготовку реагентов к анализу проводили согласно рекомендациям производителя. Реконструированные растворы биопрепаратов использовали в течение одного рабочего дня. Анализировали образцы лиофилизованной вакцины, каждый из которых содержал в вакуумированной ампуле по 0,5 мг биомассы и 3 мг глутамата натрия.

Ампулу вскрывали, вводили в нее 1 мл физраствора, инкубировали 15 мин при комнатной температуре без перемешивания, затем 60 мин при 37 °С в термостатируемой качалке при перемешивании (250 rpm), охлаждали до комнатной температуры 3-5 минут. В две пробирки вносили по 20 мкл раствора апиразы и по 100 мкл суспензии вакцины из каждой ампулы предобработанного образца. Пробу инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в одну пробирку добавляли 1 мл ДМСО, перемешивали, через минуту отбирали 20 мкл экстракта вакцины в ДМСО, помещали в кювету люминометра, добавляли 100 мкл раствора АТФ-реагента, быстро перемешивали и измеряли биолюминесцентный сигнал на люминометре ЛЮМ-1 (Люмтек, Россия). Измерения повторяли для второй пробы и рассчитывали среднее арифметическое для двух проб ($I_{ампула}$).

АТФ-контроль, как и вакцину, реконструировали в 1 мл физраствора. В две пробирки отбирали по 100 мкл раствора АТФ-контроля, добавляли по 20 мкл физраствора и по 1 мл ДМСО, перемешивали и определяли биолюминесцентный сигнал для АТФ-контроля аналогично тому, как описано выше для суспензии вакцины. Среднее арифметическое значение биолюминесцентных сигналов для двух проб АТФ-контроля ($I_{контроль}$) использовали для расчета содержания внутриклеточного АТФ в образце лиофилизованной вакцины по (1).

$$(AT\Phi)_{ампула, \text{ пикомоли}} = (AT\Phi)_{контроль} \times \frac{I_{ампула}}{I_{контроль}}, \text{ пикомоли}, \quad (1)$$

где $(AT\Phi)_{контроль}$ – содержание АТФ-контроля в исходном физрастворе, пикомоли;

$I_{контроль}$ – среднее значение сигнала биолюминесценции для АТФ-контроля, в условных единицах;

$I_{ампула}$ – среднее значение сигнала биолюминесценции для вакцины, в условных единицах.

Поскольку каждый образец содержал по 0.5 мг вакцины, то легко было рассчитать содержание внутриклеточного АТФ в 1 мг вакцины. (АТФ, пикомень/мг).

Для установления корреляции между величинами (АТФ, пикомень/мг) и (млн КОЕ/мг) использовали величины (млн КОЕ/мг), определенные классическим микробиологическим методом посева.

Результаты и обсуждение. Как уже было сказано выше, лиофилизация живых клеток является серьезным стрессовым воздействием на микроорганизмы. В ходе замораживания при подготовке к высушиванию, а также в процессе дегидратации часть клеток разрушается или теряет жизнеспособность, в результате чего в образце снижается содержание внутриклеточного АТФ. Действительно, согласно данным авторов [3] для лиофилизованной БЦЖ вакцины, реконструированной в солевом растворе, содержание внутриклеточного АТФ, измеренное сразу после реконструкции, составляет всего 0.5-1.0 пикомень АТФ на 1 млн клеток. В этих условиях для вакцины, содержащей от 1 до 10 млн клеток, практически не наблюдается зависимости содержания АТФ от КОЕ. Поэтому для реактивации клеток авторы использовали длительное (24 часа) инкубирование полученной суспензии вакцины при 37 °С в питательной среде довольно сложного состава. Первостепенной задачей в данном исследовании было модифицировать и оптимизировать условия регидратации клеток для восстановления содержания внутриклеточного АТФ в живых, не разрушенных в ходе лиофилизации клетках. В ходе сравнения различных технологических условий инкубации реконструированной вакцины мы установили, что возможно достичь более быстрой реактивации клеток путем кратковременного инкубирования (не более 3-х часов) реконструированной вакцины при 37 °С.

Было изучено влияние разбавления образца вакцины на концентрацию внутриклеточного АТФ. Образец регидратированной вакцины обработали апиразой для удаления внеклеточного АТФ. Затем получили ряд последовательных разбавлений вакцины физраствором и измерили концентрацию внутриклеточного АТФ. Как показано на рисунке 1, наблюдается хорошая линейная зависимость содержания внутриклеточного АТФ от КОЕ, которая описывается уравнением (2):

$$(AT\Phi), \text{ пикомоли/мг} = 1,52 \times \text{КОЕ}, \text{ млн/мг} \quad (2)$$

с коэффициентом корреляции $R^2 = 0.99$.

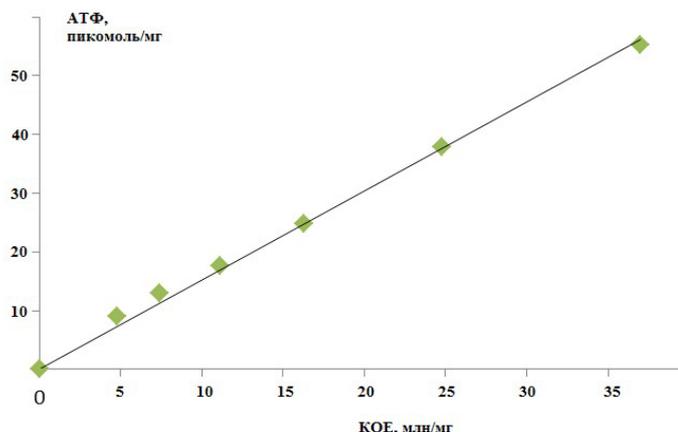


Рисунок 1 – Зависимость содержания внутриклеточного АТФ (пикомень/мг) от специфической активности (КОЕ, млн/мг) для разбавлений одного и того же образца регидратированной БЦЖ вакцины

Таким образом, предложенный метод реактивации вакцины позволил сократить длительность предварительной инкубации с 24 часов до 1 часа. Используя разработанную методику, мы определили содержание внутриклеточного АТФ в нескольких образцах лиофилизованной БЦЖ вакцины. Результаты представлены на рисунке 2.

Зависимость на рисунке 2 описывается уравнением (3):

$$(AT\Phi), \text{ пикомоли/мг} = 1,34 \times \text{КОЕ}, \text{ млн/мг} \quad (3)$$

с коэффициентом корреляции $R^2 = 0.93$. Полученное уравнение является предварительным и будет уточнено на основании измерений большого числа образцов вакцины.

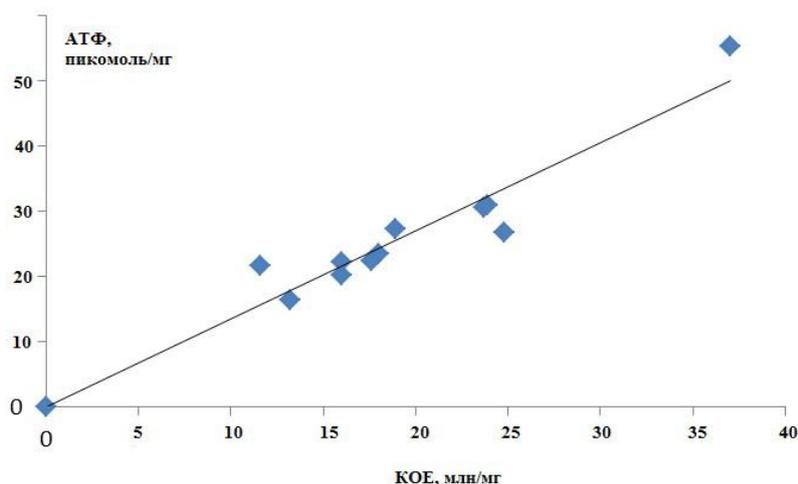


Рисунок 2 – Соотношение между содержанием внутриклеточного АТФ (пикомоль/мг) и специфической активностью (КОЕ, млн/мг) для образцов лиофилизированной БЦЖ вакцины, реконструированной в физрастворе

Следует подчеркнуть, что высокий коэффициент корреляции достигнут, в частности, благодаря использованию стандартного набора реагентов, не требующих дополнительных манипуляций. Это позволило снизить трудоемкость аналитических процедур и себестоимость анализа, что особенно важно при использовании данного метода в условиях производства лиофилизированных БЦЖ вакцин.

Список литературы / References:

1. Lomakina G.Yu., Modestova Yu.A., Ugarova N.N. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, pp. 701-713.
2. Janaszek W., Aleksandrowicz J., Sitkiewicz D. The use of the firefly bioluminescent reaction for the rapid detection and counting of mycobacterium BCG. *J. Biol. Stand.*, 1987, vol. 15, pp. 11-16.
3. Jensen S.E., Hubrechts P., Klein B.M., Haslow K.R. Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilized BCG Danish 1331 vaccine. *Biologicals*, 2008, vol. 36, pp. 308-314.
4. Ho M.M., Markey K., Rigsby P., Jensen S.E., Gairola S., Seki M., Castello-Branco L.R., Lopez-Vidal Y., Knezevic I., Corbel M.J. Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine. *Vaccine*, 2008, vol. 26, pp. 4754-4757.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ

Влах Е.Г.¹, Зашихина Н.Н.², Тенникова Т.Б.¹

¹Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет
Университетский пр., 26, Петергоф, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ

²Институт высокомолекулярных соединений, Российская академия наук
Большой пр., 31, В.О., г. Санкт-Петербург, 199004, РФ
e-mail: vlakh@mail.ru

Аннотация. Разработка полимерных носителей для адресной доставки цитостатических препаратов, используемых для терапии онкологических заболеваний, направлена на преодоление побочных отрицательных свойств подобных лекарств таких, например, как высокая токсичность, отсутствие селективности и низкая биодоступность. Одним из перспективных типов биodeградируемых частиц для создания систем доставки лекарств являются частицы, полученные на основе амфифильных полипептидов. К преимуществам данных полимеров можно отнести их высокую биосовместимость, способность к биodeградации и самоорганизации. В представляемой работе обсуждаются результаты по синтезу амфифильных полипептидов на основе α -L-аминокислот; получению наночастиц на их основе; изучению цитотоксичности, стабильности и способности к клеточной трансфекции полученных наночастиц; а также получению инкапсулированных форм цитостатических препаратов, используемых для терапии колоректального рака (иринотекан и 5-фторурацил).

Ключевые слова: амфифильные полипептиды, биodeградируемые частицы, системы доставки лекарств, противораковые препараты.