

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042557**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.27

(21) Номер заявки
202000246

(22) Дата подачи заявки
2020.09.15

(51) Int. Cl. **G09B 23/28** (2006.01)
G16B 5/00 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 5/071 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(54) БИОМИМЕТИЧЕСКАЯ IN VITRO МОДЕЛЬ УРОТЕЛИЯ СВИНЬИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПАТОГЕННОСТИ ПТИЧЬИХ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

(31) P-201900249

(32) 2019.12.18

(33) SI

(43) 2021.06.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УНИВЕРСИТЕТ ЛЮБЛЯНЫ
(SI); ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК - ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ПЕРМСКОГО
ФЕДЕРАЛЬНОГО

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(RU)

(72) Изобретатель:
Эрдани Крефт Матея, Кеш Дария (SI),
Кузнецова Марина Валентиновна
(RU), Предоевич Лука, Старич
Эрьявец Марьянца (SI)

(74) Представитель:
Изофатова С.А. (RU)

(56) RU-C2-2425425
US-A1-20110236886
CN-A-111454879

(57) Изобретение представляет собой первичную культуру нормальных уротелиальных клеток свиней (клеток НСУ) из уротелия мочевого пузыря свиньи. Клетки НСУ выращивают в лунках многолуночных пластиковых планшетов до высокого уровня дифференцировки, затем инфицируют суспензиями различных штаммов E. coli и инкубируют в течение фиксированного периода времени. Затем клетки обрабатывают протеолитическим ферментом, окрашивают трипановым синим и подсчитывают под световым микроскопом. Жизнеспособность клеток НСУ определяют как долю выживших клеток НСУ относительно отрицательного контроля. Снижение жизнеспособности клеток НСУ определяет патогенность различных штаммов E. coli. Поскольку клетки НСУ сохраняют исходные свойства, генетически и физиологически сходны с клетками уротелия человека, данные, полученные на клетках НСУ, актуальны для медицины человека. Кроме того, простота и низкая стоимость экспериментов с нашей моделью - еще одно важное преимущество, способствующее ее использованию.

B1**042557****042557****B1**

Изобретение относится к области микробиологии, клеточной биологии и медицины человека. Конкретно, изобретение относится к процедуре оценки патогенности птичьих патогенных штаммов бактерий *Escherichia coli* (АРЕС) для человека, характеризующейся тем, что используется биомиметическая модель уротелия свиньи. Настоящее изобретение также относится к определению патогенности *Escherichia coli*, выявляемой с помощью процедур настоящего изобретения, в котором предлагаются средства для оценки патогенности АРЕС с помощью простого, быстрого, экономически эффективного и релевантного с медицинской точки зрения способа (модели).

Известна модельная система рыбки данио для биомедицинских исследований (Choi T.Y., Choi T.I., Lee Y.R. et al. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med*. 2021. 53, 310-317). Также известна модельная система для изучения инфекций мочевыводящих путей и связанных с ними патологий (Barber A.E., Norton J.P., Wiles T.J., Mulvey M.A. Strengths and limitations of model systems for the study of urinary tract infections and related pathologies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016. 80(2), 351-367), которая для оценки патогенности использует модельную систему рыб. Недостаток известных модельных систем заключается в том, что их температура недостаточна для оптимального роста бактерий.

Известно использование модельных систем нематод и насекомых (Panayidou S., Ioannidou E., Apidianakis Y. Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: disease modeling, lessons, and shortcomings. *Virulence*. 2014. 5(2), 253-269; Williamson D.A., Mills G., Johnson J.R., Porter S., Wiles S. In vivo correlates of molecularly inferred virulence among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in the wax moth *Galleria mellonella* model system. *Virulence*. 2014. 5(3), 388-393; Bialek S., Lavigne J.P., Chevalier J., Marcon E. et al. Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. 54, 4373-4378). Недостатком таких моделей является большое эволюционное расстояние от человеческого организма.

Известна модельная система птиц (Zhao L., Gao S., Huan H. et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*. 2009. 155, 1634-1644). Недостаток известной модели связан с отсутствием мочевого пузыря у птиц.

Известна модель на основе клеточных линий (Leusch H.G., Drzeniek Z., Markos-Pusztai Z., Wagener C. Binding of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. *Infect Immun*. 1991. 59, 2051-2057), которая имеет недостаточный уротелиальный статус дифференцировки модели.

Наиболее близким аналогом к заявляемой биометрической модели является модельная система свиньи (Coulthard M.G., Flecknell P., Orr H. et al. Renal scarring caused by vesicoureteric reflux and urinary infection: a study in pigs. *Pediatr Nephrol*. 2002. 17(7), 481-484). В ближайшем аналоге используются органы мочевыделительной системы лабораторного животного - живой взрослой свиньи. Однако в ближайшем аналоге выращивание модельного макроорганизма обременено большими затратами времени и средств.

Технический результат заключается в устранении указанных недостатков путем использования биомиметической модели в качестве модельной системы для изучения патогенности АРЕС, которая обеспечивает простую, быструю и недорогую оценку патогенности штаммов *E. coli*, и позволяет гораздо легче следить за проявлением инфекции в контролируемых условиях *in vitro*.

Описание методики оценки патогенности АРЕС с использованием представленной модели выглядит следующим образом.

Подготовка модели включает приготовление клеточной культуры на основе нормальных уротелиальных клеток свиней (НСУ-клеток), полученных из мочевого пузыря. Клетки получают путем разобщения цельной ткани и хранят при температуре -80°C. Приготовление бактериальной культуры начинают с размораживания штаммов и подсчета количества жизнеспособных клеток. Затем клетки ресуспендируют в подходящей питательной среде, помещают во флаконы с плоским дном и культивируют. Через некоторое время клетки извлекают со дна пластиковых бутылок с помощью ферментов и пересчитывают снова. Затем суспензию клеток разводят до определенной концентрации ($\approx 1 \times 10^5$ клеток НСУ/см²) и переносят в лунки пластикового планшета. Сначала клетки выращивают до соответствующей степени дифференцировки при 37°C в присутствии 5% CO₂ с использованием питательной среды с сывороткой для усиления пролиферации (первая неделя) (Kreft M.E. et al. *Histochem Cell Biol* 2005; 123:529-539; Kreft M.E. et al. *Biol Cell* 2010; 102:593-607; Višnjić T. et al. *Histochem Cell Biol* 2012; 137:177-186), затем среду заменяют на новую среду с кальцием (Ca²⁺) для дифференцировки клеток (еще около 3 недель). После того, как клеточная культура достигнет соответствующего уровня развития (3-5 слоев уротелиальных клеток) и дифференцировки (апикальная плазмолемма наиболее дифференцированных уротелиальных клеток содержит гранулы уроплакина, и клетки плотно связаны друг с другом), биомиметическую модель уротелия инкубируют без антибиотиков еще в течение недели, после чего она может быть использована в экспериментальной инфекции.

Подготовка различных штаммов *E. coli* для проведения анализа по выявлению их патогенности в нашей биомиметической *in vitro* модели уротелия свиньи заключается в следующем.

Приготовление штаммов бактерий с целью заражения культуры клеток НСУ начинают сразу после

выделения, или идентификации, или после возрождения штаммов бактерий, которые хранились при -80°C . Штаммы, хранившиеся при -80°C , инокулируют в планшет с агаризованной средой Лурия-Бертани (LB) и инкубируют в течение ночи при 37°C . На следующий день бактериальные колонии с поверхности среды LB забирают, инокулируют в 5 мл жидкой среды LB в пробирках и повторно инкубируют в течение ночи при 37°C с аэрацией (180 об./мин). На следующий день бактериальные суспензии готовы к эксперименту.

Основной эксперимент начинают с переноса 100 мкл ночной бактериальной культуры в 10 мл свежей стерильной среды LB в конические колбы объемом 150 мл с последующей 3-часовой инкубацией при 37°C и 5% CO_2 без встряхивания. После инкубации бактериальные штаммы разводят в 2,4 мл солевого раствора в стеклянном флаконе до концентрации 10^8 бактериальных клеток/мл (0,5 по Макфарланду, стандартизируют с помощью нефелометра/денситометра). Затем бактериальные суспензии центрифугируют в течение 10 мин при $4000 \times g$ и удаляют супернатант, содержащий физиологический солевой раствор и следы жидкой среды LB, а бактериальные клетки ресуспендируют в среде для культивирования клеток UroM. При этом концентрация бактериальных клеток в суспензии разбавляется в 10 раз и составляет 10^7 бактериальных клеток/мл. Далее приготовленную в среде UroM бактериальную суспензию наносят на клеточную культуру клеток HCU, предварительно удалив жидкую фазу из каждой лунки планшета. Соотношение количества бактериальных клеток и клеток HCU составляет 10:1 в каждой лунке пластикового многолуночного планшета. После чего планшеты инкубируют в течение 3 ч при 37°C и 5% CO_2 .

Биомиметическую уротелиальную модель промывают 3×1 мл среды UroM с кальцием без сыворотки. По окончании промывания добавляют 500 мкл коммерчески доступного протеолитического фермента, например "TrypLE™Select", разрушающего белки, которые плотно связывают клетки HCU. Клетки HCU отделяются от дна лунок и друг от друга. Инкубация с ферментом "TrypLE™Select" длится 45-60 мин. После завершения инкубации 500 мкл среды UroM добавляют в каждую лунку планшета, осторожно перемешивают, переносят в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и центрифугируют в течение 5 мин при ускорении 200 g. После центрифугирования весь супернатант удаляют и снова добавляют 1 мл среды UroM. На этом этапе клетки HCU готовы к подсчету.

Для подсчета мертвых и живых клеток HCU используют стеклянные гемоцитометры с покровными стеклами. Из смеси, состоящей из 50 мкл приготовленной суспензии клеток HCU и 10 мкл 0,4% красителя трипанового синего, отбирают 10 мкл и помещают между гемоцитометром и покровным стеклом. Гемоцитометры помещают в инвертированный световой микроскоп и микроскопируют. По различиям в цвете и распределении красителя внутри каждой клетки HCU оценивают их состояние - мертвые или живые.

Определение жизнеспособности клеток HCU биомиметической модели уротелия свиньи проводят *in vitro* путем расчета процента живых и мертвых клеток HCU на мл среды (см. формулу 1). Чтобы сделать значения жизнеспособности клеток HCU сопоставимыми в независимых экспериментах, все значения были математически скорректированы в соответствии со значением отрицательного контроля (без бактерий) в каждом независимом эксперименте.

$$(1) \text{ жизнеспособность клеток HCU (\%)} = \frac{N_L \text{ инфицированные клетки}}{(N_L + N_D) \text{ отрицательный контроль}} \times 100$$

N_L инфицированные клетки - количество всех живых клеток HCU при заражении тестируемым бактериальным штаммом, подсчитанное в четырех квадратах гемоцитометра;

$(N_L + N_D)$ отрицательный контроль - количество всех живых и мертвых клеток HCU, подсчитанных в четырех квадратах гемоцитометра в отрицательном контроле.

Возможность осуществления указанного способа показана на следующих примерах. Были использованы 6 штаммов APES, выделенных от зараженных птиц (аббревиатура RB), а также 6 комменсальных фекальных штаммов *E. coli* от здоровых птиц (аббревиатура JF). Кроме того, мы также использовали уже известные и описанные природные уropatогенные штаммы человека *E. coli* J96 и 536, а также лабораторный штамм *E. coli* MG1655 и природный комменсальный (фекальный) штамм человека *E. coli* SE15.

Все вышеупомянутые штаммы были приготовлены, как это было описано ранее, и введены в нашу биомиметическую *in vitro* модель уротелия свиньи, как описано в методологии эксперимента. Сделанный нами прогноз на основе источника конкретного бактериального изолята (инфекционные или нормальные испражнения) и состояния каждого отдельного животного (инфицированное или здоровое) соответствовал фактическим результатам экспериментов.

На фиг. 1 показано распределение различных бактериальных штаммов в соответствии с их патогенностью, обозначенной как жизнеспособность клеток HCU. Уровень патогенности штамма соответствует показателю жизнеспособности клеток HCU.

Из фиг. 1 следует, что комменсальные штаммы, выделенные из фекалий здоровых птиц, как и ожидалось, в основном сгруппированы в левой части графика (штаммы JF), это означает, что они нанесли наименьшее повреждение клеткам HCU, поэтому и снижение жизнеспособности клеток было наимень-

шим. С другой стороны, патогенные штаммы *E. coli* птиц (штаммы RB), разместившиеся в центре фиг. 1, заметно снижали жизнеспособность клеток НСУ, что соответствует их более высокой степени патогенности. Оба сильных уропатогенных штамма человека J96 и 536 вызвали значительное снижение жизнеспособности клеток НСУ, они размещены в крайней правой части графика. Также видно различие в воздействии на клетки НСУ между двумя непатогенными штаммами - лабораторным штаммом MG1655 и естественным человеческим комменсальным штаммом SE15, поскольку штамм MG1655 является непатогенным лабораторным штаммом, тогда как SE15 является комменсальным штаммом с гораздо более высокой приспособляемостью.

Интересным примером является штамм RB6, который был выделен из больной птицы, но его действие на клетки НСУ было сопоставимо с действием других комменсальных штаммов. Согласно нашей модели, штамм RB6 мог быть обычным комменсальным штаммом, который при определенных условиях может вызывать инфекцию у птиц.

Результаты наших экспериментов суммированы на фиг. 1, которая показывает средние значения жизнеспособности клеток НСУ после заражения различными штаммами *E. coli* по сравнению с патогенностью каждого тестируемого бактериального штамма. JF - это комменсальные штаммы *E. coli* птиц, выделенные из фекалий здоровых птиц, RB - штаммы патогенных птиц, выделенные от больных птиц, MG1655 является хорошо известным лабораторным штаммом *E. coli*, SE15 является хорошо известным человеческим комменсальным штаммом *E. coli*, а J96 и штамм 536 являются хорошо известными уропатогенными штаммами человека.

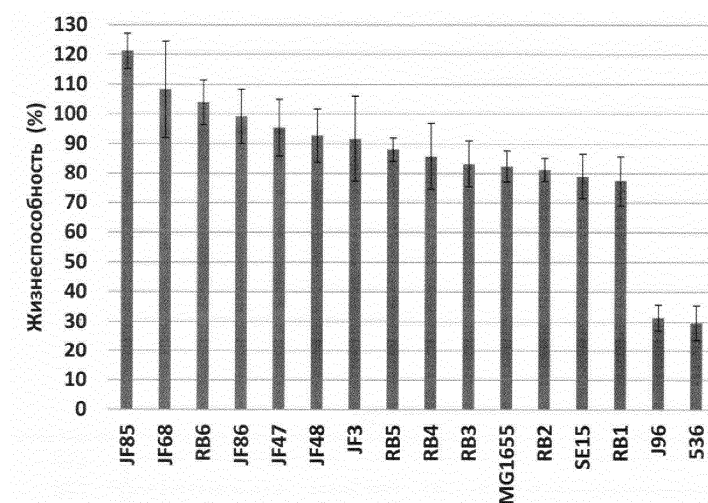
В заключение следует отметить, что распределение протестированных патогенных штаммов птиц *E. coli* на фиг. 1 среди комменсальных и непатогенных лабораторных штаммов позволяет предположить, что протестированные штаммы, патогенные для птиц, не являются патогенными для людей и, следовательно, обладают низким потенциалом для фактического возникновения зоонозов у людей.

Описанная модель обеспечивает простую, быструю и недорогую оценку патогенности штаммов *E. coli*. Созданная модель позволяет проводить как доклиническое тестирование патогенности штаммов *E. coli*, так и фундаментальные исследования механизмов патогенности штаммов *E. coli*, а также тестирование потенциальных новых антимикробных агентов. Модель позволяет использовать биологический материал, который легко доступен в качестве побочного продукта животного происхождения категории 3 (бойни, заводы по переработке свинины) и, благодаря генетическому и физиологическому сходству между организмом человека и свиньи, очень подходит для оценки патогенности штаммов *E. coli* для человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ создания биомиметической *in vitro* модели уротелия свиньи для оценки патогенности птичьих патогенных штаммов *E. coli* для человека, характеризующийся тем, что пассажи нормальных свиных уротелиальных клеток НСУ П.-Х. высевают в лунки пластиковых планшетов с плотностью 1×10^5 - 2×10^5 клеток/см², выращивают в течение 21-60 дней в CO₂-инкубаторе при постоянной температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂ и при 100% относительной влажности, в питательной среде, адаптированной для роста клеток НСУ, со сменой среды через день, получают сливной уротелий из 3-5 слоев с высокодифференцированным поверхностным слоем клеток уротелия, которые имеют гранулы уроплакина в плазмолемме апикальной части клетки и тесно связаны друг с другом, затем осуществляют приготовление бактериальной суспензии из ночной культуры бактерий, путем разведения 100 мкл в 10 мл свежей стерильной среды LB в конической колбе объемом 150 мл, инкубации в термостате в течение 3 ч при 37°C и 5% CO₂ до логарифмической фазы роста бактериальных клеток, доведения новой бактериальной суспензии до концентрации 10^8 бактериальных клеток на 1 мл суспензии с использованием нефелометра/денситометра до значения 0,5 по шкале Макфарланда, далее разбавляют бактериальную суспензию путем осаждения бактериальных клеток посредством центрифугирования, удаления супернатанта и замены его соответствующим количеством культуральной среды UroM, при этом получают новую суспензию с концентрацией бактериальных клеток 10^7 на 1 мл, осуществляют удаление культуральной среды из каждой лунки планшета и замену ее 1 мл приготовленной бактериальной суспензии с последующей инкубацией в термостате в течение 3 ч при 37°C и 5% CO₂, после инкубации из всех лунок планшета удаляют супернатант и промывают клетки НСУ культуральной средой, в конце удаляют всю среду из всех лунок и добавляют 500 мкл TrypLE Select в каждую лунку с последующей инкубацией планшета в течение 1 ч при 37°C и 5% CO₂, после инкубации с раствором TrypLE Select, когда клетки видны в виде подвижных пластинок, далее в каждую лунку планшета добавляют 500 мкл культуральной среды UroM, перемешивают, затем содержимое каждой лунки переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 200×g, после центрифугирования супернатант удаляют и добавляют 1 мл культуральной среды UroM, затем осажденные уротелиальные клетки тщательно ресуспендируют, после чего осуществляют перенос 50 мкл суспензии из приготовленных уротелиальных клеток в стерильные микроцентрифужные пробирки, добавляют 10 мкл трипанового синего, перемешивают и 10 мкл полученной смеси помещают в гемоцитометр, просматривают в гемоцитометре на инвертиро-

ванном световом микроскопе, подсчитывают все живые и мертвые уротелиальные клетки в 4 квадратах гемоцитометра и рассчитывают значение жизнеспособности клеток в % из отношения количества всех живых клеток НСУ при заражении тестируемым бактериальным штаммом к количеству всех живых и мертвых клеток НСУ в отрицательном контроле.



Фиг. 1

