

**ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ПРОМЫСЛОВЫХ ЖИВОТНЫХ**

Т.В. Гальнбек, Г.Т. Акиншина, К.В. Кулешов

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко, Москва, tatyana-galnbek@yandex.ru

В статье отражены данные о работе Коллекции культур клеток сельскохозяйственных (с/х) и промысловых животных, созданной на базе Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ). Разработаны методы контроля клеточных культур на контаминации микоплазмами и клетками другого видового происхождения. Впервые получены данные о чувствительности к возбудителю токсоплазмоза различных клеточных линий из коллекции

ВИЭВ. Определена ведущая роль стандартизации условий инфицирования токсоплазмами культур клеток и их дальнейшего поддержания для получения высокоспецифичных культуральных антигенов.

Ключевые слова: коллекция, культуры клеток, токсоплазма, полимеразная цепная реакция, контаминация.

Коллекция культур клеток с/х и промысловых животных (СХЖ РАСХН) и Криобанк создавались во Всероссийском НИИ экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ), начиная с 1970 г. С 1982 г. коллекция имеет официальный статус в составе Российской коллекции клеточных культур (РККК). Уникальность коллекции заключается в широком наборе культур клеток, полученных из неопухолевых органов и тканей животных (домашних, мелких домашних, диких и др.). Основной состав культур имеет отечественное происхождение. Создавалась и развивалась коллекция под руководством Заслуженного деятеля науки РСФСР, Лауреата премии Совета Министров СССР, доктора биологических наук, профессора, чл.-корр. РАЕН Дьяконова Л.П. (1, 2).

В настоящее время в Коллекции хранятся штаммы и постоянные линии клеток 21 вида животных (более 4000 тысяч образцов хранения). Кроме того, депонировано 8 штаммов гибридом-продуцентов моноклональных антител к иммуноглобулинам с/х животных, к антигенам вирусов, микоплазм и прионов (3).

Коллекция регулярно пополняется за счет новых поступлений и масштабирования имеющихся сертифицированных культур и является национальным достоянием России. За 2008—2013 гг. в коллекцию поступило 24 линии, в том числе: от крупного рогатого скота — 4; свиней — 2; овцы — 1; крысы — 1; мышей (гибридомы) — 6; рыб — 9; человека — 1.

Культуры клеток сохраняются в криобанке как после первичного изолирования, так и во время постоянного культивирования. Осуществляется разработка оптимальных методов изолирования, сохранения, стандартизации клеточных линий и штаммов, включая определение их биологических свойств. Разработаны и постоянно совершенствуются режимы криогенизации применительно к конкретным культурам (4,5).

Особое внимание уделяется стабильности культурально-морфологических, кариологических (включая определение кариотипа) и других свойств культур клеток, в частности, чувствительности к вирусам и патогенным простейшим — облигатным

внутриклеточным паразитам, а также к действию лекарственных препаратов в фармакотоксикологическом скрининге (6).

Специально изучается возможность и степень микопlasма-контаминации, а также случаи контаминирования вирусами, внутриклеточными паразитами и прионами. Разрабатываются методы деконтаминации и сертификации в целях биобезопасности клеточного материала (7, 8, 9). В настоящее время разработана и активно используется методика на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющая проводить идентификацию и видовую дифференциацию восьми видов микоплазм: *Acholeplasma laidlawii*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. bovis*, *M. hyorhinis*, *M. salivarium*, *M. pirum* и *M. orale*, являющихся наиболее частыми источниками контаминации культивируемых клеточных линий. Разработанный подход может являться основным инструментом контроля контаминации микоплазмами и использоваться в целях сертификации и паспортизации коллекционных клеточных линий (10).

В мировой практике лабораторий, работающих с длительно культивируемыми клеточными линиями, показаны случаи несоответствия видовой принадлежности исследуемой клеточной линии, что по мнению исследователей, может быть следствием как перекрестной контаминации клеточных линий при неаккуратной работе исследователя, так и перепутывании клеточных линий в ходе длительного культивирования. В нашей лаборатории разработана методика, которая основана на ПЦР с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяющая проводить идентификацию клеточных линий человека и 12 видов животных. Данная модификация ПЦР позволяет упростить ход анализа и улучшить аналитические характеристики метода. Для видовой идентификации клеточных культур в качестве мишени нами используется митохондриальная ДНК, а, именно, гены, кодирующие цитохром b и субъединицу I цитохром-с-оксидазы. Высокая чувствительность и специфичность методики позволяет достоверно определять присутствие единичных клеток постороннего вида в исследуемой культуре, при одновременной высокой концентрации балластной ДНК. С помощью данного метода проверена видовая принадлежность 25 коллекционных клеточных линий или их отливок, используемых в разнообразных областях для исследований. Метод является быстрым, несложным в реализации на базе многих лабораторий и стандартизируемым, что свидетельствует о его преимуществе по сравнению с используемыми в настоящее время кариологическим и изоферментным анализами, традиционной видоспецифической ПЦР и электрофоретической детекцией продуктов (11,12).

Успехи в области культивирования вирусов и развитие метода клеточных культур позволили решить проблему культивирования патогенных простейших, возбудителей заболеваний человека и животных. *Toxoplasma gondii* — возбудитель токсоплазмоза человека и животных относится к группе облигатных внутриклеточных паразитов, которых до сих пор не удалось культивировать ни на одной синтетической или полусинтетической среде в отсутствие клеток. Метод культур клеток открыл широкие возможности для изучения токсоплазм как в теоретическом отношении, в частности, при исследовании взаимоотношений в системе «паразит-хозяин» на клеточном и субклеточном уровнях (13), так и практическом — при испытании химиотерапевтических препаратов (14), изолировании штаммов, идентификации и выделении паразитов, в развитии методов дифференциальной диагностики, при разработке диагностических препаратов и т.д. (15). Практическому использованию клеточных культур при изучении возбудителя токсоплазмоза способствовало обнаружение его цитопатогенного действия в культурах клеток, а также, выявление широкого спектра клеточных культур разного видового и тканевого происхождения, чувствительных к токсоплазмам.

Однако для успешного культивирования токсоплазм недостаточно знать основные требования, предъявляемые к культивированию клеток. Нами разработаны оптимальные условия размножения паразитов в культивируемых клетках, накопления максимального их количества, а также условия поддержания и хранения штаммов в разных температурных режимах.

Впервые было проведено сравнительное изучение чувствительности к возбудителю токсоплазмоза широкого набора типов клеток-хозяев с/х животных, в основном, депонированных в коллекции ВИЭВ, разной видовой, органной и тканевой принадлежности. Необходимость наличия в Коллекции клеток данных об их чувствительности к заражению облигатными внутриклеточными паразитами крайне актуально и для прикладной, и для фундаментальной паразитологии. Нами были разработаны и стандартизованы новые экспериментальные модели острой и хронической токсоплазмозной инфекции в клеточных системах ЛЭК (легкое эмбриона коровы), ПК (почка кролика), СПЭВ (почка эмбриона свиньи). Определение ведущих параметров стандартизации разработанных экспериментальных моделей острой и хронической инфекций — необходимое условие прижизненной паразитологической диагностики и получения высокоспецифичных клеточных антигенов (16).

В настоящее время на основе регламентации разработанных моделей заканчиваются исследования их в качестве продуцентов биомассы токсоплазм для получения клеточных антигенов (соматического, полученного из инфицированных культур клеток, и метаболитного — полученного из культуральной жидкости инфицированных культур). Использование разработанных нами моделей инфицированных первичнотрипсинизированных и перевиваемых культур клеток животных из криобанка ВИЭВ (ПТ-80 — почка эмбриона коровы, ЛЭК) позволило прийти к заключению, что наилучшие результаты обусловлены в основном условиями стандартизации инфицирования культур клеток и их дальнейшего поддержания, а не выбором самой клеточной системы.

За 2008—2013 гг. опубликована 71 научная работа в отечественных и зарубежных изданиях. Сотрудники приняли участие в 26 международных конференциях. Издано 5 методических рекомендаций, получено 3 патента, подана 1 заявка на патент. Издана монография «Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии)» Москва, 2009, 654 с. и «Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных» Москва, 2011, 155 с.

Список литературы

1. **Дьяконов Л.П., Поздняков А.А., Гололобова М.Т.** Поддержание штаммов, создание криобанка первичных и перевиваемых культур клеток. Труды 2-й Всесоюзной конференции биологической промышленности, Москва, 1981: 17—19.
2. **Дьяконов Л.П.** Коллекции должны пополняться. Ветеринарная газета. 1994, 2 (38).
3. **Гулюкин М.И., Дьяконов Л.П., Какпаков В.Т., Гальнбек Т.В., Акиншина Г.Т., Киселева Д.Р., Завьялова Е.А.** Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных (3-е издание). Москва, 2011, 155 с.
4. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии), под редакцией **Дьяконова Л.П.**, Москва, изд. «Спутник+», 2009, 656 с.
5. **Фридман М.Л., Гальнбек Т.В.** Методические рекомендации по получению и культивированию кератиноцитов кожи плодов кролика, кошки, собаки. Москва 2008, 12 с.
6. **Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В., Киселева Д.Р., Годовых Е.В.** Действие некоторых антираковых препаратов на немалигнизированные постоянные культуры клеток животных, Труды ВИЭВ. 2010, 76: 194—200.
7. **Алексеенкова С.В., Юров Г.К., Гальнбек Т.В., Калита И.А., Юров К.П.** Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи крупного рогатого скота — необходимые условия производства биологических перпаратов. Российский ветеринарный журнал. 2013, 1: 15—18.
8. **Гальнбек Т.В., Ломакина Н.Ф., Потапова И.В.** Вирусная контаминация культур клеток. Труды ВИЭВ. 2013, 77: 228—233.
9. **Гальнбек Т.В., Киселева Д.Р., Кулешов К.В., Сайфутдинова З.Н., Потапова И.В.** Поиск соединений, обладающих антимикоплазменной активностью. Веткорм. 2013, 4: 23—24.

10. **Кулешов К.В., Гальнбек Т.В.** Разработка методики идентификации и видовой дифференциации микроорганизмов рода *Mycoplasma* в клеточных линиях с использованием полимеразной цепной реакции. Веткорм. 2013, 4: 47—48.

11. **Кулешов К.В.** Методические рекомендации по определению видовой принадлежности клеточных культур методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ). Москва. 2008, 19 с.

12. **Кулешов К.В., Завьялова Е.А., Гальнбек Т.В.** Видовая идентификация клеточных линий. Веткорм, 2013, 4: 49—50.

13. **Акиншина Г.Т.** Моделирование развития облигатных внутриклеточных паразитов в клеточных культурах и цитозеологические аспекты их взаимодействия в системе «паразит-клетка (хозяин)». В кн. «Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии)». Москва, 2009: 557—595.

14. **Акиншина Г.Т., Алимов А.Г., Шилов А.М.** Возбудитель токсоплазмоза: лекарственная резистентность и вирулентность возбудителя при моделировании инфекции в клеточных системах и на мышах. Ветеринарная патология, 2009, 1 (28): 5—10.

15. **Акиншина Г.Т., Гулюкин М.И., Гальнбек Т.В., Алимов А.Г.** Методические положения по культивированию и длительному хранению в культурах клеток возбудителя токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*, *Sporozoa*) в научных и производственных паразитологических лабораториях. Москва, 2012, 11 с.

16. **Акиншина Г.Т., Гулюкин М.И., Алимов А.Г., Гальнбек Т.В.** Методические положения по стандартизации параметров воспроизведения экспериментальных моделей острого и хронического токсоплазмоза *in vivo* и *in vitro*, используемых для получения антигенов. Москва, 2013, 13 с.