

## ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОЛЛЕКЦИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

*Н.П. Глинских, А.А. Бахарев, И.В. Устьянцев*

ФБУН "Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций" Роспотребнадзора,

Екатеринбург, [virus@etel.ru](mailto:virus@etel.ru)

Криобанки клеточных культур являются необходимым элементом медицинских и биотехнологических исследований. Объединение локальных банков в Российскую коллекцию клеточных культур определило возможность их взаимодействия и дальнейшего развития на основе общих баз данных и паспортизации клеточных линий и штаммов. Это позволило получать культуры с определенными характеристиками, пригодные для получения качественных иммунобиологических препаратов и сопоставимых результатов при проведении вирусологических и биологических исследований с использованием клеточных культур. Благодаря этому в Екатеринбургском НИИ вирусных инфекций разработаны методы тестирования на токсичность различных веществ, а также разработан и всесторонне охарактеризован лечебный препарат на основе диплоидных клеток человека, успешно применяющийся для лечения ожогов, пародонтозов и некоторых других заболеваний, связанных с нарушениями обменных процессов в организме.

**Ключевые слова:** коллекция клеточных культур, криобанк, вирусология, токсикология, диагностика, клеточная терапия.

Межведомственный научно-технический совет по проблемам молекулярной биологии при Президиуме Академии наук СССР 29 мая 1978 года принял решение о необходимости создания Всесоюзной коллекции клеточных культур (ВСКК) путем организационного объединения уже имевшихся в отдельных институтах коллекций клеток человека, животных и растений. Руководство и координацию работы ВСКК осуществляла комиссия Межведомственного научно-технического совета под руководством директора Института цитологии АН СССР, член-корр. АН СССР Афанасия Семеновича Трошина и его заместителей Раисы Георгиевны Бутенко и Георгия Петровича Пинаева. Институт цитологии

АН СССР был определен научно-методическим и информационным центром Всесоюзной коллекции клеточных культур. Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения (ЕСКК) Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (ЕНИИВИ) одна из первых вступила в ВСКК. Ее бессменным руководителем является директор института проф., Заслуженный деятель науки РФ Н.П.Глинских. Координатором работы ВСКК, а затем Российской коллекции клеточных культур (РККК), до последних дней жизни являлся профессор, д.б.н., Заслуженный деятель науки РФ Г.П. Пинаев.

Основные научные исследования в ЕСКК были направлены на создание базовой коллекции клеток, отработку условий поддержания и стабилизации свойств клеточных культур и повышение их чувствительности к вирусам. Были отработаны методы культивирования и принципы паспортизации клеточных культур, а также условия их транспортировки на дальние расстояния. Еще в 1970 году в институте было положено начало созданию низкотемпературного банка — музея клеточных культур, позволявшего обеспечить их сохранность в исходном состоянии в течение многих лет. Первоначальная коллекция состояла всего из 6 культур. В настоящее время она включает более 70 клеточных линий, из которых более половины получены в Лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ, паспортизированы согласно международным требованиям и внесены в каталог РККК (1). Коллекция продолжает обеспечивать проведение исследований по получению и паспортизации клеточных культур, стандартизации условий их культивирования, разработке новых питательных сред, изучению процессов взаимодействия в системе вирус — клетка. Большое внимание уделяется диплоидным клеточным линиям.

Коллекционные клеточные линии были использованы для определения токсичности различных материалов (2) и объектов внешней среды. Были выполнены довольно широкие экологические исследования качества питьевых вод Урала, эффективности методов их очистки, оценки уровней воздействия на клетки неконтролируемых органических и металлоорганических загрязнителей (3). Были проведены, также, исследования взаимодействия загрязнителей объектов внешней среды с некоторыми вирусами, и на модели клеточных культур показано значительное ускорение развития вирусной инфекции в условиях экологического неблагополучия (4).

Новый этап работы Лаборатории клеточных культур начался с 1998 года, когда по просьбе врачей-практиков и при поддержке Облздора Свердловской области и Управления здравоохранения г. Екатеринбурга была разработана и осуществлена Программа по

внедрению биомедицинских технологий в практическое здравоохранение. Применение созданного в ЕНИИВИ препарата диплоидных клеток человека для терапевтических целей в настоящее время вызывает немалый интерес. Препарат применяется в ожоговых центрах ДГКБ №9 и ГКБ №40, ряде стоматологических клиник, в Отделении гнойной хирургии ГКБ № 23 и других медицинских учреждениях Екатеринбурга, Челябинска, Тюмени и Саха-Якутии.

Для развития биотехнологических исследований в нашей лаборатории используется авторская линия диплоидных клеток эмбриона человека ЛЭЧ-4 (81). Эта клеточная линия была получена в 1981 году Н.П. Глинских, Г.Г. Колесниковой и др. из легочной ткани 12-ти недельного эмбриона. Эмбрион был взят у здоровой женщины, не имеющей в генеалогии злокачественных или наследственных заболеваний (произошел травматический выкидыш). В работе используется культура 5—25 пассажа (5, 6, 7).

Доклинические исследования эффективности и безопасности созданного нами препарата "Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии" были проведены в Лаборатории клеточных культур нашего института, на Кафедре терапевтической стоматологии Уральской государственной медицинской академии, в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Филиале ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России - ЦВТП БЗ» и на базе Питомника служебных собак учреждения ИЗ-66/1. Все исследования выполнены в соответствии с требованиями соответствующих нормативных документов Минздравсоцразвития РФ. Испытания были проведены на мышах, хомячках, крысах, морских свинках, кроликах и собаках. Прежде всего, препарат был испытан на туморогенную активность в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН на линии мышей BALB/C (nude). При введении 1 млн. клеток ЛЭЧ-4(81) не было выявлено каких-либо клинических или морфологических признаков опухолевого роста, как в месте введения препарата, так и в критических органах: региональных лимфатических узлах и легких. При введении аналогичным мышам клеток контрольной линии А-549 у большинства мышей наблюдали стандартный рост раковых опухолей, подтвержденный с помощью гистологических методов.

Терапевтическую эффективность препарата культивируемых клеток человека определяли с помощью трех методов:

- 1) по оценке формирования монослоя клеток на стекле по Фармакопейной статье предприятия;

2) по реакции регенерации повреждённых кожных покровов белой крысы на экспериментальной модели ожога;

3) по реакции регенерации тканей пародонтального комплекса на экспериментальной модели пародонтита у белых крыс Вистар (8).

Все испытанные дозировки препарата показали отчетливо выраженный терапевтический эффект даже в экспериментах на животных: начальные этапы эпителизации наступали уже на следующие сутки в опыте и на 3—4 сутки в контроле. Полная эпителизация ран при использовании клеток наступала на 3—4 сутки в опыте и на 6—7 сутки в контроле (9).

Учитывая важное научное и практическое значение применения клеточной культуры в комплексном лечении пародонтита, были проведены экспериментальные исследования на животных с целью изучения процессов регенерации при использовании различных остеопластических препаратов (ГапКол, КоллаПан), способствующих направленному остеогенезу и стимуляции восстановительных процессов в тканях пародонта. В опытах на животных с экспериментальным пародонтитом было убедительно доказано, что композиции на основе клеточной культуры и остеопластического препарата стимулируют процессы регенерации тканей пародонта (10, 11, 12).

Механизмы действия клеточной культуры на регенерацию тканей обусловлены рядом факторов. Во-первых, аллофибробласты, внесенные в раневой дефект, являются источником проколлагена, что способствует формированию экстрацеллюлярного матрикса. Во-вторых, культивированные фибробласты, внесенные в рану, выделяя основной фактор роста фибробластов, способствуют активации ангиогенеза, что не происходит при использовании синтетических материалов (8).

В острых и хронических экспериментах на мышах, белых крысах, морских свинках и кроликах проведено изучение общетоксических и органотропных свойств препарата "Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии". При введении препарата беспородным белым мышам было показано, что его терапевтические дозы способствуют комплексному повышению активности интерлейкинов и ростовых факторов, обеспечивающих ход конструктивного воспалительного процесса в организме, отрицательные же реакции наступают лишь при значительном превышении терапевтических доз. Препарат не оказывает сенсibiliзирующего действия на организм (8). Изучение свойств препарата в опытах на морских свинках и кроликах, проведенное в условиях введения препарата внутримышечно и в виде накожных аппликаций, подтвердило, что он не вызывает развития

реакции гиперчувствительности немедленного или замедленного типа, очевидно, из-за отсутствия антигенов гистосовместимости.

Проведенные доклинические испытания показали выраженное позитивное действие препарата в большинстве экспериментов на животных. Однако маловероятно, что клетки человека смогли бы прижиться и размножиться в организме животного. На этом основании можно сделать вывод, что основным действующим началом в препарате являются ростовые факторы и цитокины, тем более что имеется ряд публикаций, указывающих на повышенное выделение культивированными клетками ростовых факторов, что впоследствии было подтверждено нашими исследованиями. Содержание некоторых ростовых факторов и цитокинов в ростовой среде может до 500 раз превышать среднюю норму в крови человека (13).

Основным недостатком препарата на основе живых клеток является очень малый срок годности — всего 7 суток с момента его изготовления. В настоящее время проходят испытания новые формы препарата с большим сроком годности — до 1 года, не содержащие ДНК, способной к репликации (14, 15). Исследования на животных подтвердили их безопасность и высокую эффективность. Более того, такой препарат при первичных испытаниях на животных проявил противовирусную (противогерпетическую) активность, что требует дополнительного изучения (16, 17). По итогам работ, как по исследованию цитотоксичности препарата, так и, особенно, по разработке лечебного препарата получен ряд патентов.

Среди научно-исследовательских задач лаборатории на последующие годы определены разработки новых диагностических и профилактических препаратов на основе клеточных технологий и получение новых клеточных культур для целей вирусологии и биотехнологии.

### Список литературы

1. **Каталог** Российской коллекции клеточных культур. Санкт-Петербург, Омск, 1999.
2. **Патент** RUS 2148644 «Способ контроля цитотоксичности биогелей с использованием штамма перевиваемых лейкоцитов человека Л-41 КД/84». 10.05.2000.
3. **Бахарев А.А., Бахарева Т.Л., Рябухин И.В. и др.** Изучение токсического действия некоторых соединений тяжёлых металлов на клеточных культурах. Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций. Труды Всероссийской научной конференции Военномедицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 2009: 334—335.
4. **Глинских Н.П., Бахарев А.А., Забокрицкий А.Н., Ладыгин О.В.** Цитопротективное действие комплекса биологически активных веществ, продуцируемых пробиотическими

бациллами рода *Bacillus*, на культуру клеток Л-41. Вестник Российской Военно-медицинской академии, 2008, 2, 1: 142—143.

5. Патент 2392318 «Способ получения стабильных клеточных культур». 17.11.2008.

6. Патент 2398873 «Способ получения препаратов для медицинских целей». 13.03.2009.

7. Патент 2213775 «Клеточная культура для заместительной терапии». 10.10.2003.

8. Новикова И.А., Бахарев А.А., Забокрицкий А.Н., Ладыгин О.В. Возможные механизмы влияния диплоидных клеток на репаративные процессы. Вестник Российской Военно-медицинской академии, 2008, 2,1: 142.

9. Патент 2230500 «Способ лечения ожоговых ран на основе применения культивированных клеток». 18.06.2002.

10. Патент 2210352 «Композиция для лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе клеточных культур». 20.08.03.

11. Патент 2204332 «Способ лечения воспалительных заболеваний пародонта». 07.11.2001.

12. Патент 2210341 «Способ получения трансплантатов для заполнения костных дефектов при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта». 07.12.2001.

13. Глинских Н.П., Мезенцева М.В., Устьянцев П.В., Осипова В.А. Препараты культуры клеток для заместительной терапии как продуценты цитокинов. Нанотехнологии. 2012, 5: 90—93.

14. Бахарев А.А., Устьянцев П.В., Глинских Н.П. Создание иммунобиологического препарата на основе активных веществ диплоидных клеток. Международная конференция: "Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций" (специальный выпуск). С-Петербург, 2013.

15. Бахарев А.А., Шмелева Н.А., Бахарева Т.Л., Устьянцев П.В. и др. Возможность использования лиофилизированного препарата на основе биологически активных веществ диплоидных клеток. Труды научно-практической конференции: "Диагностика и профилактика инфекционных болезней". ГНЦ вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирск, 2013: 171.

16. Глинских Н.П., Донник И.М., Порываева А.П., Шилова Е.Н., Устьянцев И.В. Использование лиофилизированного препарата аллофибробластов для лечения заболеваний, вызванных вирусом герпеса. Ветеринарный вестник Урала. 2012, 7: 25—27.

17. Порываева А.П., Мальчиков И.А., Шмелева Н.А., Бахарев А.А. Исследования действия препарата Мирамистин на инфекции, вызванные вирусом простого герпеса *in vitro*. Вестник Уральской медицинской академической наук. 2012, 3: 37—39.