

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.

#### **ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЛЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Р.Я. Подчерняева, М.В. Мезенцева, И.А. Суетина, О.А. Лопатина, Г.Р. Михайлова,**

**А.Д. Петрачев, Л.А. Потапова, О.В. Бакланова, Е.Л. Фирсова, О.М. Гринкевич,**

**Т.Н. Притчина, М.Н. Щетвин, Л.И. Руссу**

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва, [cells@rambler.ru](mailto:cells@rambler.ru)

В Лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского создана Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных, которая входит в состав Российской коллекции клеточных культур. Для каждой клеточной линии разработан паспорт, согласно международным требованиям. Проводится постоянная работа по улучшению условий хранения и культивирования клеток в зависимости от различных сред, сывороток или их заменителей, а также постоянный мониторинг микоплазм, вируса бычьей диареи и других возбудителей инфекций. Проведен поиск клеточных линий, чувствительных к различным ДНК- и РНК-содержащим вирусам, включая вирусы гриппа. На моделях клеточных культур изучалась эффективность различных противовирусных препаратов — амантадина, ремантадина, арбидола, тамифлю, ингаверина, циклоферона, ридостина, неовира, амиксина и 15 нейротропных пептидов, обладающих иммуномодулирующей и противовирусной активностью в отношении вирусов герпеса, гриппа человека и птиц. На моделях культур клеток проводилось изучение закономерностей синтеза регуляторных цитокинов в зависимости от условий культивирования клеток. Совместно с контрольным Институтом им. Л.А. Тарасевича (Москва) была получена вакцинная линия клеток Vero(B), охарактеризованная по требованиям ВОЗ. Линия применяется не только для научных исследований, но и для получения первой в стране противогерпетической отечественной вакцины «Витогерпавак».

**Ключевые слова:** клеточные культуры, сыворотки, бессывороточная среда, вирусы, цитокины, вакцина.

В настоящее время клеточные культуры находят широкое применение в различных областях биологии, медицины, ветеринарии и биотехнологии. Использование клеточных культур позволяет исследовать биологические процессы, которые сложно, а подчас невозможно, изучить на уровне организма. Важную роль клеточные культуры играют в биотехнологии при производстве многих вакцин, тест-систем и биологически активных веществ. Культуры клеток применяют для диагностики заболеваний различной этиологии, в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических, лечебных и косметических средств, а также пищевых добавок. Все это требует стандартизации работы с клеточными культурами в специально оборудованных лабораториях. Для успешного сохранения исходных или направленно измененных свойств клеточных линий, а также для получения воспроизводимых экспериментальных результатов необходимо зафиксировать данное состояние культивируемых клеток. Функцию поддержания исходных свойств клеток и

проведения контроля за их состоянием осуществляют Коллекции клеточных культур, сохраняющие эталонные клеточные линии, которые содержатся в криоконсервированном состоянии.

Еще в 1989 г. в нашей стране были разработаны методические указания: «Аттестация перевиваемых клеточных линий-субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов» (РД42-28-10-89), выполнению которых и по сей день придерживаются в работе с культурами клеток. В нашей Лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского подготовлены методические рекомендации: «Работа с клеточными культурами (культивирование первичных и перевиваемых клеток)» (1) и «Технологический процесс криоконсервации перевиваемых клеточных линий» (2), которые были утверждены на Ученом совете института и на Лабораторном Совете Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. На базе нашей лаборатории имеется Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных. Фонды коллекции представлены в «Каталоге Всесоюзной коллекции клеточных культур» (3), в «Human and Animal cell lines Catalogue» (4) и в «Каталоге Российской коллекции клеточных культур (РККК)» (5). Для каждой клеточной линии разработан паспорт, согласно международным требованиям, где, в частности, подробно описаны условия культивирования. Одним из ингредиентов, наиболее нестабильных при культивировании клеток, является сыворотка. Ее свойства существенно зависят от источника получения. Учитывая нестандартность сывороток, по рекомендации ВОЗ мы использовали малосывороточные питательные среды из гидролизатов соевой и рисовой муки, разработанные в НПО «Вектор» под руководством Л.П. Сандахчиева. Оптимизированный состав этих сред представляет собой определенные концентрации ферментативных гидролизатов, растворенных в сбалансированных растворах Эрла или Хенкса, в которые дополнительно добавлены витамины, микроэлементы и отдельные аминокислоты. Показано, что для пролиферации клеток МДСК (клетки почки собаки) при культивировании с соевой средой достаточно добавление только 2% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), а для пролиферации клеток Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) требуется добавление 5% FBS. Таким образом, использование соевой среды позволяет снизить количество сыворотки, необходимой для успешного культивирования этих клеток с 10% до 2—5%. Надо отметить, что морфология и кариология клеток МДСК и Vero не менялась при использовании соевой среды (6—8).

Для проведения биотехнологических исследований на современном уровне желательно для культивирования клеток применять полностью бессывороточные среды. Список таких сред, как правило, широко представлен во многих каталогах, но, к сожалению, их цена слишком высока. Поэтому мы провели работу с применением отечественной бессывороточной среды «Гибрис-2» производства ООО «ПанЭко». Адаптация клеток к этой среде проводилась поэтапно. Так, для получения адаптированной линии клеток МДСК к среде «Гибрис-2» было проведено 4 пассажа с 3% FBS, 3 пассажа с 2% FBS, 5 пассажей с 1% FBS и 6 пассажей без сыворотки. Показано, что индекс пролиферации (ИП), идентичный контрольным значениям, был отмечен только в присутствии 1—2% FBS, а культивирование без сыворотки не приводило к контрольным показателям. Возможно, требуется большее количество пассажей для полной адаптации клеток к бессывороточной среде (9,10).

С целью оптимизации работы с нативными сыворотками было исследовано влияние сывороток северных оленей, суягных овец, свиней и морских котиков на пролиферативную активность 2-х клеточных линий — ЛЭЧ (клетки легких эмбриона человека) и Vero. Контролем служили эксперименты с использованием сыворотки FBS. Было показано, что сыворотки из крови северных оленей можно успешно использовать для культивирования клеток Vero, которые наиболее часто применяются для биотехнологических целей.

Однако вопрос стандартизации условий культивирования клеток в зависимости от наличия доброкачественных сывороток или их заменителей не утрачивает своего значения. Поэтому, были проведены исследования по получению и применению так называемых ростстимулирующих белков (РБ), выделенных из сывороток северных оленей, суягных овец и свиней с помощью водного раствора полиэтиленгликоля с М.м. 4000—8000 Д, который способствует также удалению ряда контаминирующих агентов. РБ представлены главным образом альбуминовой и  $\alpha$ -глобулиновой фракциями, которые являются белковыми факторами роста, влияющими на пролиферацию клеток. Изучена пролиферативная активность 7 клеточных линий после 5-ти последовательных пассажей в среде с РБ из сывороток свиней, суягных овец и оленей без добавления сыворотки FBS и с 2% FBS. Показано, что для получения показателей индекса пролиферации (ИП), равнозначных с контролем, все же необходимо добавление 2% сыворотки FBS. Показатели ИП разных клеточных линий различались незначительно. Лучшие показатели ИП наблюдались в экспериментах с РБ из сывороток оленей и свиней (11,12).

При работе с культурами клеток не менее важным является применение ферментов для диспергирования или отделения клеток от субстрата при их пересевах. Для этих целей, как известно, можно применять трипсин или химопсин. Недостатком этих ферментов является то, что сырье для их получения не стандартизовано и не исключает наличия в них патогенных примесей. Поэтому, совместно с сотрудниками НПО «Вектор», мы провели изучение полученного ими препарата «Коллаза», который представляет собой комплекс протеолитических ферментов с коллагенолитической активностью, выделенных из экологически чистого гепатопанкреаса Камчатского краба с помощью хроматографической очистки и ультрафильтрации. При применении этого фермента по сравнению с трипсином количество жизнеспособных клеток было в 2—2,5 раза больше и требовалось более короткое время воздействия. При этом морфология культивируемых клеток 10 изученных линий оставалась без изменения. Таким образом, использование «Коллазы» при культивировании оказалось более эффективным, чем использование трипсина.

Существенной проблемой при работе с клеточными культурами является микробная контаминация клеток, т.к. она влияет на метаболизм клеток, вызывает хромосомные aberrации и изменяет клеточные функции. Частым контаминантом клеточных культур оказывается вирус бычьей диареи (ВД), относящийся к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* и являющийся возбудителем вирусной диареи — болезни слизистых крупного рогатого скота. Этот вирус может проникать в клетки из нативных сывороток крупного рогатого скота и даже FBS, добавленных в ростовую среду (13). Так, с помощью метода ПЦР было выявлено наличие ВД в коммерческих FBS, полученных из различных фирм (ПАНЭКО, ООО Биолот, Gibco, Biowest, HyClone, Amimed, Sigma). В сыворотках FBS фирмы ПАНЭКО ВД обнаруживается как до, так и после прогревания в водяной бане при 56°C в течение 30 и даже 60 минут (14).

Мы проводили определение ВД с помощью метода ПЦР в клеточных линиях из нашей коллекции. Исследовались диплоидные клетки легкого и фибробласты эмбриона человека, клетки онкогенных и лимфобластоидных линий человека, перевиваемые клетки обезьян, крупного рогатого скота, собаки, свиньи, крыс, мышей, хомячка, кролика, кошки, овцы, хорька и кур. Клетки хранились в жидком азоте в течение различного периода. Было показано, что диплоидные клетки человека и ряд перевиваемых клеток барана, свиньи, хомячка, обезьян и человека не были контаминированы ВД. Однако в 30% клеточных линий из 83-х изученных

был выявлен ВД, причем чаще всего в более поздних закладках. Очевидно, при культивировании этих клеток использовались сыворотки, содержащие этот вирус (15).

Одним из пунктов паспорта клеточной линии является чувствительность к репродукции вирусов. Изучение чувствительности разных клеточных линий к определенным вирусам крайне важно для приготовления противовирусных вакцин. Вирусам свойственен определенный круг хозяев, узкий для одних видов и очень широкий для других. Генетический аппарат вирусов представлен как ДНК, так и РНК в одно- или двунитевой, линейной или циркулярной, моно- или фрагментарной формах. К РНК-содержащим вирусам позвоночных относятся 20 видов вирусов (арена, артери, астро, бирна, борна, бунья, геле, дельта, калици, корона, нода, ортомиксо, парамикса, рабдо, рео, ретро, тога, фило и флави вирусы), включая субвирусные агенты вероиды, сателлиты и прионы. К ДНК-содержащим вирусам позвоночных относятся 11 видов вирусов (адено, анелмо, асфар, гепадна, герпес, иридо, папиллома, парво, покс, полиома и цирко вирусы). Название этих видов вирусов связано либо с их морфологией, либо с местом их изоляции. Интерес к проблеме поиска клеточных линий, чувствительных к различным ДНК- и РНК-содержащим вирусам, позволил нам суммировать различные данные и представить их в виде таблиц 1—4 (16,17).

Таблица 1.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции ДНК-содержащих вирусов.**

<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
1	Гепатит В	HepG2, первичные гепатоциты
2	Вирусы простого герпеса (1-2 типов):	Vero, CV-1, Hep-2, RK-13, ВНК-21, ЛЭЧ
	Герпес 6 типа	MT4, СЕМ, Н9
	Герпес 8 типа HHV-8	BCBL-1. BC-3
3	Цитомегаловирус	Vero, ЛЭЧ, ФЭЧ
4	Аденовирусы (1-31 типов)	HeLa, Hep-2, Vero, МДСК, PS,A549, Chang liver, PK-15

Таблица 2.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции энтеровирусов.**

<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
1	Полиовирусы (3 типа)	HeLa, Hep-2, CV1, Chang liver, Vero, ЛЭЧ, RD, BGM
2	Коксаки А(26 типа)	HeLa, Hep-2, RD, RK-13, BGM,
3	Коксаки В(11 типов)	HeLa, Hep-2, BGM, МДСК
<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
4	ЕСНО(28 типов)	HeLa, Hep-2, BGM, RD, RK-13, Vero
5	Ротавирусы (24 типа)	МА-104, MDBK
6	Гепатит А	Vero, CV-1, BSC-1, LLC-MK2, Frhk-4/R, 4647
7	Гепатит С	Huh-7.5.2, первичные гепатоциты

Таблица 3.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции орто-, пара- и ретровирусов.**

<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
1	<b>Ортомиксовирусы:</b>	
	а) Вирус гриппа человека типа А (H1N1, H2N2, H3N2)	МДСК, Chang Conjunctiva, 4647, Vero, Mpf, СПЭВ
	б) Вирус гриппа человека типа В	МДСК, СПЭВ
	в) Вирус гриппа птиц (H5N3)	МДСК, Chang Conjunctiva, СПЭВ, Vero, Mpf, ФЭК, CPvFK
2	<b>Парамиксовирусы:</b>	
	а) Парагрипп (4 типа)	Vero, МА-104, Hep-2, ЛЭЧ, HeLa
	б) Метапневмовирус HMPV(3 типа)	Chang Conjunctiva(KnoH 1-5C-4), CREK
	в) Паротит	ФЭК, ФЭЧ, Vero
	г) Корь	Vero, ЛЭЧ, МДСК, ФЭЧ, ФЭК
	д) Краснуха	Vero, 4647

3	<b>Ретровирусы:</b> ВИЧ (2 типа)	MT4, CEM, Molt, H9,U937
---	-------------------------------------	-------------------------

Таблица 4.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции арбовирусов.**

N n/n	Тип вирусов	Чувствительные культуры клеток
1	<b>Семейство <i>Togaviridae</i>:</b>	
	а) Синдбис (карельская лихорадка)	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	б) Чикунгунья	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
2	<b>Семейство <i>Bunyaviridae</i>:</b>	
	а) Крымская Конго Геморагическая лихорадка	Vero, ВНК-21, SW-13
	б) Калифорнийская (КСГ)	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	в) Батан	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	г) Укуниеми	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	д) Москитная лихорадка (Сицилия, Неаполь)	Vero E6
	е) Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС)	Vero E6
3	<b>Семейство <i>Flaviviridae</i>:</b>	
	а) Клещевой энцефалит	Vero E6, СПЭВ, Нер-2
	б) Западный Нил	Vero, ВНК-21, СПЭВ
	в) Денге	Vero, ВНК-21, СПЭВ

Обычно различают острую и хроническую вирусную инфекцию. Острая инфекция характеризуется цитопатическим действием (ЦПД), которое возникает в результате репродукции вирусов и приводит к деструктивным изменениям зараженных клеток и их гибели. При хроническом течении инфекции вирусы не вызывают гибели клеток. Клетки долго остаются жизнеспособными и внешне не отличаются от зараженных.

Характер ЦПД при различных вирусных инфекциях неодинаков. Например, при репродукции парамиксовирусов и герпес-вирусов наблюдается слияние клеток с образованием синцития, при энтеро- и рео-вирусах — сморщивание и деструкция клеток,



аденовирусы приводят к агрегации клеток. Обычно вирусные включения выявляются в цитоплазме или ядре клеток при специальном окрашивании по Романовскому.

Подробнее остановимся на репродукции в клетках вирусов гриппа. Известно, что в мире постоянно отмечается сложная эпидемиологическая ситуация с распространением вирусов гриппа различных типов (18—20). Изучением чувствительности различных клеточных культур к разным штаммам вируса гриппа мы занимались, начиная с 1990 г., когда был изучен спектр чувствительности ряда клеточных линий человека и животных к разным эталонным штаммам вирусов гриппа А (H1N1, H2N2, H3N2), гриппа В и С, изолированным во время различных эпидемий. Так, было показано, что эталонный штамм вируса гриппа A/PR8/34 (H1N1) активно репродуцировался в клетках животных (МДСК, СПЭВ, ВНК-21, ПЭК и Vero) и в клетках человека Chang Conjunctiva (клон 1-5C-4) и ФЭЧ в отличие от эталонного штамма A/FM1/47(H1N1). Отечественный штамм вируса гриппа A/СССР 012/79(H1N1) репродуцировался в клетках МДСК до 4,5 lg ТЦД50 и до 3,5 lg ТЦД50 в клетках ЛЭЧ. Другой отечественный штамм A/СССР 03/81 (H1N1) слабее репродуцировался в клетках МДСК (2,0 lg ТЦД50), но размножался в клетках человека Chang Conjunctiva и ЛЭЧ до титра 3,5 lg ТЦД50. Эталонный вирус гриппа А/Сингапур1/57(H2N2) наиболее активно репродуцировался в клетках СПЭВ (3,5 lg ТЦД50) и МДСК (2,5 lg ТЦД50). Штамм A/СССР05/80 (H3N2) активно репродуцировался в клетках МДСК (4,5 lg ТЦД50) и ЛЭЧ (3,5 lg ТЦД50). Штамм А/Филиппины2/82(H3N2) в основном активно репродуцировался в клетках МДСК (3,5 lg ТЦД50). Эталонный вирус гриппа В (штамм В/Ли/40) репродуцировался в клетках животных МДСК, СПЭВ, ВНК-21, ПЭК до титров 2,5; 3,5; 2,5; 1,5 lg ТЦД50 соответственно и в клетках человека ЛЭЧ до титра 3,5 lg ТЦД50. Другой эталонный вирус гриппа штамм В/Сингапур 222/71 также репродуцировался в клетках животных (МДСК, СПЭВ, ВНК-21 и ПЭК) и в клетках человека ЛЭЧ и Chang Conjunctiva. Отечественный штамм В/СССР 100/83 размножался практически в этих же клетках. Эталонный вирус гриппа С (штамм Тейлор1233/47) репродуцировался в клетках МДСК, СПЭВ и Chang Conjunctiva до титра 2,5 lg ТЦД50. Таким образом, было показано, что для каждого штамма вирусов гриппа даже одного типа (H1, H2, H3) имеется наиболее перmissive клеточная линия для изучения репродукции вирусов.

Еще в 1991 г. нами было показано, что вирусы гриппа птиц могут размножаться в ряде клеточных культур. В частности, вирус гриппа птиц, изолированный в 1976 г. в нашей стране, с 5-м типом гемагглютинина (штамм А/морской голубок/Астрахань/76(H5M1) репродуцировался не только в клетках МДСК до 4,5 lgТЦД50, но и в других линиях: клетках почки свиньи — СПЭВ

(3,5 lg ТЦД50), обезьяны — 4647 (3,5 lg ТЦД50) и сирийского хомячка — ВНК-21 (4,5 lg ТЦД50). Эти показатели практически не отличались от репродукции птичьего вируса H5N1 (штамм А/крачка/ЮА/61), активно размножающегося в клеточных линиях МДСК (4,5 lg ТЦД50), СПЭВ (4,5 lg ТЦД50), L929(4,0-4,5 lg ТЦД50) и ВНК-21 (4,0 lg ТЦД50).

Известно, что наиболее чувствительной и перспективной моделью для изучения вирусов гриппа являются клетки хорька. Поэтому нами для изучения птичьего вируса H5N1 применялась линия нервных клеток мозга хорька (Mrf). Рядом исследователей было отмечено, что с 1998 г. во время эпидемий гриппа, вызванного вирусом А(H3N2), среди больных нередко наблюдались проявления неврологического синдрома (21). В связи с этим, мы изучили репродукцию вирусов гриппа человека H1N1, H3N2 и В, выделенных не только в последние, но и более ранние эпидемические годы, на модели нервных клеток хорька (линия Mrf), а также глиальных клеток глиобластомы человека (линия GL6) в сравнении с двумя другими клеточными линиями: клеток почек собак (МДСК) и клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ). Показано, что вирусы гриппа H1N1 репродуцируются в культуре клеток линии Mrf в такой же степени, как и в клетках МДСК, но не размножаются в глиальных клетках человека (GL6). Интересно, что не наблюдалось различий в степени репродукции вирусов гриппа H1N1, выделенных в эпидемии 1934, 1947, 1977 и 1999 гг., несмотря на различие их антигенных и биологических свойств. Вирусы гриппа H3N2, также как и вирусы H1N1, репродуцируются в клетках Mrf практически в той же степени, как и в клетках МДСК, и несколько слабее в линии клеток ЛЭЧ. Отличий в активности репродукции штаммов, выделенных в эпидемии гриппа H3N2 (1968, 1999 и 2002 гг.), также не отмечено, как и у вирусов гриппа H1N1. Вирусы гриппа В репродуцируются только в клетках МДСК и значительно слабее в клетках ЛЭЧ. Интересно, что вирусы гриппа В совсем не размножаются в клетках линий GL6 и Mrf в отличие от вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2). При этом различий в репродукции штаммов вирусов гриппа В, изолированных в эпидемии 1972, 1998 и 1999 гг., не наблюдалось, также, как и у штаммов вирусов гриппа А (22). Таким образом, впервые показано, что для вирусов гриппа А чувствительной клеточной моделью являются культивируемые нервные клетки мозга хорька, которые могут быть использованы как для изоляции этих вирусов, так и для проведения различного рода биологических исследований. Интересно, что для птичьего вируса H5N1, как и для вируса гриппа человека типа В, эта клеточная линия не является перmissive.

С 1997 г. отмечаются вспышки птичьего гриппа (H5N1, H5N3, H7N7, H9N2), которые не только приводили к гибели домашних птиц, но и вызывали случаи заболевания человека с

высоким уровнем летальности. После выделения нового вируса гриппа птиц с 5-м типом гемагглютинина, изолированного, в частности, от больной утки (штамм А/утка/Новосибирск 56/05 H5N1), была выявлена чувствительность к этому вирусу 16-ти культур клеток человека и животных. В сравнительном аспекте в этих же культурах изучили репродукцию штамма А/крачка/ЮА/61 (H5N3), изолированного в 1961 г. Показано, что Штамм А/утка/Новосибирск 56/05 имеет более широкий спектр хозяев, чем штамм А/крачка ЮА/61. Наиболее чувствительными клеточными линиями животных являются клетки почки собаки (МДСК), свиней (СПЭВ), обезьян (Vero), кошек (CRFK и СС-81) и первичные клетки куриных фибробластов (ФЭК). Из клеточных культур человека чувствительными являются клетки карциномы кишечника (HT 29), Chang Conjunctiva и ЛЭЧ. Штамм 2005-го г. изоляции слабо размножался в других клетках человека (Chang liver и 2-х линиях гепатомы печени — СН5, Lunet), но, в отличие от штамма А/крачка ЮА/61, репродуцировался в клетках мозга хорька (Mpf) до титра 3,0 Ig ТЦД50 (17,22). Из полученных данных можно заключить, что вирус 2005-го года изоляции обладает большей тропностью к ряду клеток животных и человека и потенциально может быть более вирулентным при эпизоотии и эпидемиях, вызванных птичьим вирусом с 5-м типом гемагглютинина.

Нами была изучена также чувствительность 19 перевиваемых клеточных линий человека и животных к новому метапневмовирусу (HMPV), изолированному в нашей стране из носоглоточного смыва больного. Показано, что чувствительными культурами оказались клетки Chang conjunctiva (клон 1-5С-4) и клетки линии CRFK с титром 1,2 Ig ТЦД50. В остальных клеточных линиях репродукция вируса была менее 1,0 Ig ТЦД50.

На протяжении многих лет на моделях клеточных культур нами проводились исследования по изучению различных противовирусных препаратов (амантадина, ремантадина, арбидола, тамифлю, ингаверина, циклоферона, ридостина, неовира, амиксина и др.). В последнее время при создании новых лекарственных средств изучено 15 нейротропных пептидов, обладающих противовирусной активностью в отношении вирусов герпеса, гриппа человека и птиц (23).

Помимо этого, в течение ряда лет нами на моделях культур клеток проводилось изучение экспрессии генов различных цитокинов (24—26). Мы исследовали перевиваемые клеточные линии L-41 (клетки костного мозга, выделенные от больного лейкемией, клон J-96), HeLa, МДСК, L-929 и ЛЭЧ после первого и 10-го пассажей культивирования. В этих линиях клеток в динамике определяли мРНК цитокинов: ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18 с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной

транскрипцией (ОТ-ПЦР). Было отмечено различие в экспрессии генов цитокинов на разных стадиях культивирования клеток в зависимости от клеточной линии. Так, при пассировании клеток L41 угнетался синтез мРНК противовоспалительного цитокина ИЛ-4, но активировались мРНК ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-18, секретируемые клетками макрофагального типа. Особенно заметно изменялся цитокиновый профиль в культуре клеток МДСК после 10-го пассажа, в том числе не обнаруживались конститутивно вырабатываемые мРНК ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-18, которые ответственны за процессы апоптоза. При длительном пассировании клеток L-929 была дополнительно отмечена экспрессия гена противовоспалительного цитокина ИЛ-6. Известно, что в отличие от перевиваемых клеточных линий, диплоидные клетки млекопитающих в процессе пассирования претерпевают ограниченное число клеточных делений перед тем, как переходят в нечувствительное непролиферирующее состояние. Они имеют ограниченную продолжительность жизни и не растут после определенного числа пассажей, отражающего предельное число удвоений клеточных популяций для данной линии. В течение процесса старения показатели функциональной активности этих клеток претерпевает как количественные, так и качественные изменения. Нами показано, что диплоидная клеточная линия легкого эмбриона человека (ЛЭЧ) после первого пассажа продуцирует 7 цитокинов: ИФН- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-18. После 15 пассажа у этих клеток угнетался синтез ИЛ-8 и ИЛ-18, а после 23-го пассажа дополнительно угнетался синтез ИЛ-2, ИЛ-10 и ИЛ-18. Исходя из этих данных, следует учитывать иммунобиологические изменения в длительно пассируемых клетках, которые влияют на их пролиферацию и жизнеспособность и, соответственно, на чувствительность к репродукции вирусов.

Учитывая, что с 1995 г. ВОЗ рекомендует разрабатывать вакцины от гриппа с использованием в качестве субстрата перевиваемых культур клеток, аттестованных в соответствии с международными требованиями, нами совместно с контрольным Институтом им. Л.А. Тарасевича (Москва) была получена вакцинная линия клеток Vero(B), охарактеризованная по требованиям ВОЗ. 200 ампул с клетками этой линии были заложены в жидкий азот в виде посевного и рабочего банков (27). Линия применяется не только для научных исследований, но и для получения первой в стране противогерпетической отечественной вакцины «Витогерпавак» (28). При сравнительном изучении вакцины «Витагерпавак» и противогерпетической вакцины, приготовленной в Институте вакцин и сывороток (Санкт-Петербург) на первично-трипсинизированных клетках куриных эмбрионов, показано, что в клетках Vero(B) вирус герпеса репродуцировался активнее на 1,5-2,0 lg ТЦД50.

В нашей стране культуры клеток используются для приготовления большого количества диагностических препаратов и тест-систем для выявления микоплазм, ВИЧ, вирусов герпеса, гепатита А, гриппа, RS, аденовирусов. Разработаны также тест-системы для выявления антител у больных клещевым энцефалитом, лихорадкой Западного Нила, крымской геморрагической лихорадкой, Денге, Чикунчунья, тест-системы для выявления антигенов перечисленных вирусов в переносчиках и различные вакцины: против полиомиелита, гепатитов А и В, кори, паротита, краснухи, гриппа, клещевого энцефалита, герпеса и др. (27). Следует отметить, что при изучении чувствительности к вирусам на моделях клеточных культур и приготовлении различных медико-биологических препаратов необходимо использовать чистые, паспортизованные линии клеток и соблюдать оптимальную технологию их культивирования, а также использовать генетически однородную популяцию вирусов.

В заключение надо подчеркнуть, что наличие в нашем институте Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных дает возможность проводить широкий спектр исследований в области вирусологии, иммунологии, молекулярной биологии, био- и нанотехнологии (23—34).

### Список литературы

1. Работа с клеточными культурами (культивирование первичных и перевиваемых клеток). Методические рекомендации. М., 2009, 17 с.
2. Технологический процесс криоконсервации перевиваемых клеточных линий. Методические рекомендации. М, 2009, 15 с.
3. Каталог Всероссийской коллекции клеточных культур, С. Петербург, Наука, 1991. 190 с.
4. Human and Animal cell lines Catalog, Interlay Project, 1993.
5. Каталог Российской Коллекции клеточных культур (РККК), С. Петербург, Омск, 1999.
6. **Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Мартюшина Р.О., Трошкова Г.П., Подчерняева Р.Я.** Питательная среда на основе гидролизата рисовой муки для культивирования клеток и чувствительности к вирусам гриппа. Клеточные технологии, биология и медицина, 2009, 2: 113—117.
7. **Михайлова Г.Р., Мазуркова Н.А., Подчерняева Р.Я., Рябчикова Е.И., Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н.** Морфологическая и кариологическая характеристики клеток MDCK и Vero(B) при культивировании в питательных средах на основе растительных гидролизатов. Вопросы вирусологии. 2011, 2: 9—14.
8. **Михайлова Г.Р., Подчерняева Р.Я., Мазуркова Н.А., Лопатина О.А., Фирсова Е.Л.** Сравнительное изучение кариологических характеристик клеток Vero(B), восстановленных в различных питательных средах после длительной криоконсервации. Информационный бюллетень «Клеточные культуры», Санкт-Петербург, 2013, 29: 79—85.
9. **Подчерняева Р.Я., Бакланова О.В., Глушенко Л.А., Исаева Е.И., Честков В.В., Табаков В.Ю., Михайлова Г.Р.** Репродукция вирусов гриппа в клетках MDCK,

адаптированных к росту в бессывороточной среде «Гибрис-2». Вопросы вирусологии. 2010: 47—49.

10. **Подчерняева Р.Я., Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Бакланова О.В., Честков ВВ., Табаков В.Ю.** Адаптация клеток к росту в мало- и бессывороточной средах. Инф. бюллетень «Клеточные культуры». 2010, 25: 70—74.

11. **Исаева Е.И., Мазуркова Н.А., Скарнович М.О., Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н., Подчерняева Р.Я.** Оптимизация роллерного культивирования вакцинных штаммов вирусов гриппа А и В в культурах клеток MDCK и Vero при использовании компонентов растительного происхождения. Биотехнология. 2010, 6: 21—27.

12. **Мазуркова Н.А., Сумкина Т.П., Трошкова Г.П.** Разработка питательной среды на основе соевого гидролизата, полученного с использованием бромелаина, для клеток MDCK. Тезисы Международной научной конференции «Новые технологии, инновации, изобретения», Мальдивские острова, «Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований», 2011, 6: 38—39.

13. **Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И.** Вирусы и вирусные вакцины. М. 2007, 522 с.

14. **Подчерняева Р.Я., Урываев Л.В., Дедова А.В., Дедова Л.В., Ионова К.С., Михайлова Г.Р., Парасюк Н.А., Гринкевич О.М., Селиванова Т.К., Гребенникова Т.В. Петрачев А.Д., Щетвин М.Н.** Определение микоплазм и вируса бычьей диареи в коллекционных клеточных линиях. Инф. бюллетень «Клеточные культуры», С.Петербург, 2011, 27: 80—88.

15. **Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Парасюк Н.А., Мезенцева М.В., Костина Л.В., Гущина Е.А., Подчерняева Р.Я., Гребенникова Т.В.** Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. Вопросы вирусологии, 2012, 57, 5: 15—21

16. **Подчерняева Р.Я., Лопатина О.А.** Чувствительность культивируемых клеток к вирусам. В кн. «Методы культивирования клеток», СПб, 2008: 84—95.

17. **Дерябин П.Г., Львов Д.К., Исаева Е.И., Данлыбаева Г.А., Подчерняева Р.Я., Щелканов М.Ю.** Спектр клеточных линий позвоночных, чувствительных к высокопатогенным вирусам гриппа А/крачка/ЮА/61(Н5№) и А/крачка/Новосибирск 56/05( Н5N1). Вопросы вирусологии, 2007, 1: 45—48.

18. **Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В., Малышев Н.А., Базарова М.В., Меркулова Л.Н., Дерябин П.Г., Кузьмичев А.Г., Федякина И.Т., Гребенникова Т.В., Усачев Е.В., Садыкова Г.К., Шевченко Е.С., Трушакова С.В., Лаврищева В.В., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Белякова Н.В., Иванова В.Т., Оскерко Т.А., Латышев О.Е., Беляев А.М., Беляев А.Л., Феодоритова Е.Л.** Распространение нового пандемического вируса гриппа А/Н1N1 М в России. Вопросы вирусологии, 2010, 3: 4—10.

19. **Львов Д.К., Бурцева Е.И., Лаврищева В.В.** Информация Центра экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РФ АМН об итогах эпидемического сезона 2009—2010 гг. по гриппу и ОРВИ в мире и в России. Вопросы вирусологии, 2011, 1: 44—49.

20. **Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М., Еропкин М.Ю., Киселев О.И.** Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа Н1N1, вирусам гриппа птиц, свиней, человека. Вопросы вирусологии, 2011, 4: 14—19.

21. **Каверин Н.В., Смирнов Ю.А., Межвидовая передача вируса гриппа А и пандемия гриппа.** Вопросы вирусологии 2003, 3: 4—10.

22. Подчерняева Р.Я., Исаева Е.И., Данлыбаева Г.А., Михайлова Г.Р. Репродукция вирусов гриппа в культуре клеток мозга хорька (Mrf). Ветеринарная патология, 2006, 1: 107—109.

23. Мезенцева М.В., Андреева Л.Н., Подчерняева Р.Я., Исаева Е.И., Шаповал И.М., Щербенко В.Э., Мясоедов Н.Ф. Нейротропный пептид, обладающий противовирусной активностью в отношении гриппа человека и птиц при герпесвирусной инфекции. Инфекция и иммунитет, 2011, 1: 81—84.

24. Мезенцева М.В., Подчерняева Р.Я., Урываев Л.В., Щербенко В.Э., Зуев В.А. «Направленная коррекция цитокиновой регуляторной сети при вирусных инфекциях». Вестник Российской Академии Естественных наук, 2011, 11, 1: 9—13.

25. Подчерняева Р.Я., Мезенцева М.В. Клеточные культуры как модель исследования механизмов синтеза цитокинов. Сборник «Интерфероны 2011», М. 2012: 417—424.

26. Руссу Л.И., Мезенцева М.В., Подчерняева Р.Я. Исследование механизмов синтеза цитокинов на моделях перевиваемых и первичных кожно-мышечных клеточных линиях. Медицинский академический журнал. Приложение. Материалы II-й Всероссийской научной конференции молодых ученых: “Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия.” Санкт-Петербург, 2012: 398—400.

27. Подчерняева Р.Я., Хижнякова Т.М., Михайлова Г.Р., Шалунова Н.В., Петручук Е.М., Бердникова З.Е. Линия клеток Vero(B) для приготовления медикобиологических препаратов, Вопросы вирусологии, 1996, 4: 183—185.

28. Бархалева О.А., Ладыжинская И.П., Воробьева М.С., Шалунова Н.В., Подчерняева Р.Я., Михайлова Г.Р., Хорошева Т.В., Баринский И.Ф. «Витагерпавак» первая отечественная вакцина на перевиваемой линии клеток Vero(B). Вопросы вирусологии, 2009, 5: 33—37.

29. Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С., Подчерняева Р.Я., Лопатина О.А. Исследование пролиферативной активности и жизнеспособности клеток фибробласта и глиобластомы на различных типах углеродных нанотрубок. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 153, 2: 227—232.

30. Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С., Подчерняева Р.Я., Лопатина О.А. Перспективы использования углеродных нанотрубок в качестве каркасного материала в инженерии биологических тканей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011, 6, 1: 85—90.

31. Бобринецкий И.И., Селезнёв А.С., Гайдученко И.А., Федоров Г.Е., Домантовский А.Г., Пресняков М.Ю., Подчерняева Р.Я., Михайлова Г.Р., Суетина И.А. Исследование взаимодействия нервных клеток с сетками углеродных нанотрубок, полученными при химическом осаждении из газовой фазы. Биофизика, 2013, 58 (3): 524—530.

32. Руссу Л.И., Мезенцева М.В., Егорова Е.М., Суетина И.А., Потапова Л.А., Сосенкова Л.С., Гущина Е.А. Влияние наночастиц серебра на экспрессию генов цитокинов в клетках фибробластов эмбриона человека. Сборник трудов Всероссийской научной конференции молодых ученых: «Медико-биологические аспекты химической безопасности». Санкт-Петербург, 2013: 253—254.

33. Руссу Л.И., Суетина И.А., Потапова Л.А., Остроумов С.А., Мезенцева М.В. Изучение *in vitro* потенциального действия на иммунитет наночастиц окислов металлов Cu и Fe. «Инновации в науке» № 10 (23) Сборник статей по материалам XXVI Международной научно-практической конференции. Новосибирск, 2013: 23—28.

34. Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Firsova E.L., Gushhina E.A. Effect of single walled carbon nanotubes on the biological properties of the cell cultures of human embryonic

fibroblasts. 3rd International Scientific and Practical Conference "Science and Society" ISPC 2013, 3:175—184.

## **ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛАБОРАТОРИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ ИНСТИТУТА НЕЙРОХИРУРГИИ**

***В.М. Семенова***

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев,

[seveme22@rambler.ru](mailto:seveme22@rambler.ru)

В обзоре представлены основные направления научной работы Лаборатории культивирования тканей Института нейрохирургии. Охарактеризованы результаты научных разработок и особенности методических подходов в проведенных исследованиях с применением методов культивирования в зависимости от поставленных целей и задач.

**Ключевые слова:** методы культивирования, нейроклетки, опухоли мозга.

Лаборатория культивирования тканей в Институте нейрохирургии организована в 1962 г. по инициативе первого директора института — акад. А.И. Арутюнова и зав. Отделом нейропатоморфологии проф. Б.С. Хоминского. Создание такой лаборатории было продиктовано необходимостью получить модель экспериментального роста опухолей мозга для углубленного изучения их гистобиологических свойств. Метод культивирования тканей был успешно освоен канд. мед. наук Т.П. Верхоглядовой в Московском Институте морфологии человека под руководством акад. А.Д.Тимофеевского. В 1963 г. были получены первые результаты эффективного роста астроцитомы в первичной культуре. Со временем Лаборатория культивирования тканей стала серьезной базой для оригинальных экспериментальных исследований в области нейроонкологии и нейробиологии. Проф. Т.П. Верхоглядова руководила лабораторией до 1992 г.

Основным научным направлением лаборатории было изучение гистобиологических особенностей роста различных опухолей мозга в эксплантационных культурах. На первом этапе в культурах глиальных опухолей центральной нервной системы (ЦНС) были исследованы фенотипические особенности клеточного состава, архитектура пространственного роста и пролиферативная активность клеток. С помощью комплекса цитохимических методов выявления в опухолевых клетках нуклеиновых кислот, гликогена,