

## ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПОЧЕК НОВОРОЖДЕННЫХ КРОЛЬЧАТ В ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

И.С. Глаголева<sup>1</sup>, Э.М. Плотникова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия

### Possibility of application primary cell culture of kidney newborn rabbits in vaccines production

I.S. Glagoleva<sup>1</sup>, E.M. Plotnikova<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

<sup>1</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

В данной статье описывается возможность применения первичных культур клеток в производстве вакцинных препаратов для животноводства. Приведено сравнительное описание применения органных культур, клеточных линий и штаммов в вирусологии. В статье проанализированы различные методы получения первичных культур. Также представлены данные авторов по изучению чувствительности первичных культур клеток к различным вирусным агентам сельскохозяйственных животных на примере культуры клеток почек новорожденных крольчат

**Ключевые слова:** первичная культура клеток, почка новорожденных кроликов, вирус.

### Культуры клеток в вирусологии

Культуры клеток применяются в ветеринарных и биомедицинских областях для скрининга лекарственных препаратов, получения вакцин [1]. Вакцинопрофилактика до настоящего времени остается основным ветеринарно-санитарным мероприятием [2]. При изготовлении вакцин для выращивания вирусов можно применять ткани любого вида животных. Тем не менее, на сегодняшний день остается актуальной проблема выведения новых клеточных линий, чувствительных к вирусам — возбудителям болезней людей и животных.

Начало массовой вакцинации против вирусных заболеваний человека и животных в 1950-х годах дало толчок для развития методов крупномасштабного культивирования свежеизолированных клеток человека и животных. Развитие клеточных технологий позволило широко использовать клетки животных в различных вирусологических исследованиях *in vitro*. Для изучения свойств вирусов, используют органные культуры и клеточные культуры [3].

Использование органных культур в научных вирусологических исследованиях не лишено недостатков. Жизнеспособность таких культур мала в связи с недостаточной трофикой кусочков ткани и ограниченным ростом клеток. Подсчет количества клеток, входящих в состав кусочка ткани, очень сложен, что представляет трудности в ряде работ, связанных с определением параметров вирус-клеточных взаимодействий, например, множественности заражения в пересчете на одну клетку, а также урожайности вируса в клетке [3]. В связи с этим культуры клеток получили более широкое распространение в вирусологии, как наиболее стабильные и восприимчивые системы для культивирования и исследования вирусов.

Широкое использование клеточных штаммов и линий в вирусологической практике связано с простотой

Possibility of application of primary cell cultures in production of vaccines for domestic animals has been presented in this paper. Also the comparative description of application of organ cultures, cell lines and strains in virology has been provided. We have analyzed the different methods of receiving primary cultures. Also we presented our own data of primary cell cultures sensitivity to various virus agents of domestic animals on the example of the cell culture of kidney newborn rabbits.

**Key words:** primary cell culture, kidney newborn rabbits, virus.

их культивирования, однородностью клеточного состава и возможностью подсчета клеток. Клеточные линии представляют собой незаменимую биосистему для титрования вирусов и изучения биохимических и молекулярно-биологических механизмов вирусного размножения в клетках [4]. Однако утрата типичных для исходной ткани свойств клеток не позволяет использовать клеточные штаммы и линии в качестве идеальной модельной системы для исследований вирусов *in vitro*. Подразумевается, что идеальной клеточной моделью является наиболее близкая к исследуемому объекту модель, позволяющая получать результаты сходные с результатами, полученными при использовании исследуемого объекта. Все выше перечисленное привело исследователей к использованию первичных клеточных культур в качестве наиболее близкой к условиям *in vivo* модельной системы для изучения различных свойств всевозможных вирусов.

### Первичные культуры клеток

Триумфом применения метода тканевых культур в вирусологии явилось создание эффективных вакцин против полиомиелита на первичных культурах клеток почек обезьян [5]. Первичные культуры клеток сыграли в дальнейшем выдающуюся роль в развитии вирусологии и вирусной вакцинологии. До сих пор первичные культуры остаются основным клеточным субстратом при производстве различных противовирусных вакцин. Это связано с тем, что исторически первые культуральные вирусные вакцины были приготовлены на этом типе культур клеток и показали высокую эффективность, и безопасность на протяжении длительного периода времени [6].

Клетки эмбрионального происхождения при культивировании обычно сохраняют жизнеспособность более продолжительное время, чем полученные

из тканей взрослых организмов [7]. Первичные культуры клеток получают как из целых эмбрионов животных, так и из отдельных выбранных тканей взрослых животных, новорожденных и эмбрионов. Эмбрионы или ткани измельчают и обрабатывают протеолитическими ферментами, например, трипсином для разобщения межклеточных связей. Полученные таким образом первичные культуры клеток содержат смесь всех клеточных типов, свойственных исходной ткани. Первичные культуры клеток, полученные из различных органов человека и животных, в настоящее время широко применяются в вирусологии. При этом принято считать, что в организме исследуемые клеточные показатели изменяются аналогично экспериментальным данным, полученным *in vitro* [8].

Культуры первичных клеток легко получить из многих тканей. При успешном установлении культуры первичные клетки начинают размножаться и их необходимо периодически пересевать (субкультивировать). Субкультивирование обеспечивает возможность продления существования культуры (получение линии клеток), клонирования, исследования и сохранения клеток, а также получения более однородных популяций. Главным преимуществом получения клеточных линий из первичных культур является наработка большого количества стабильного материала, пригодного для продолжительного использования [9].

На данный момент существует ряд перевиваемых культур клеток кроликов:

– культуры клеток почек (ПК-82, ПоКр, РК-13, РК-13/91), кожи (РСК), печени (ПчКр), роговицы глаза (SiRC).

– культуры клеток новорожденных крольчат (ПНК-86), эмбрионов кроликов (культуры клеток мышц, почек, сердца).

Однако известно, что перевиваемые линии клеток менее чувствительны к вирусам [10]. Клетки первичной культуры обычно гетерогенны и характеризуются малым пролиферативным пулом, но в них наиболее полно представлены типы клеток той ткани, откуда они были получены, и четко обнаруживается наличие ряда свойств, присущих данной ткани. При этом предпочтительнее получать биологический материал от новорожденных животных, поскольку он содержит большее количество прогениторных клеток, а также обладает меньшей иммуногенностью, чем клетки и ткани взрослых животных [11]. Есть данные о получении первичной культуры клеток из различных органов: получение однослойной первично-трипсинизированной культуры клеток из почки куриного эмбриона [12]; получена первичная культура клеток мозга крупного рогатого скота [13].

Для культивирования вирусов в научно-исследовательских и производственных целях используют первичные культуры клеток из почечной ткани животных [14]. Выбор почечной ткани обусловлен легкой дезагрегацией ткани детергентами, относительной неприхотливостью клеток к условиям культивирования, широким спектром чувствительности к вирусам животных и человека [15]. Была показана возможность получения первичной культуры клеток почек кроликов 25–35 дневного возраста. Однако такая методика имеет ряд недостатков: 1) с увеличением возраста кроликов до 35 дней степень покрытия клетками поверхности стекла или пластика за 14 дней составляет лишь 25–75%; 2) с увеличением пассажа субкультивирования наблюдается

понижение чувствительности к вирусам, а к 11-му passages культура становится нечувствительной к ним; 3) культура клеток почек до 6 пассажа более чувствительна к вирусу миксоматоза кроликов, чем культура после 6 пассажа и даже постоянная линия РК-13; 4) выращивание крольчат до 28–35-дневного возраста предполагает дополнительные экономические затраты на уход и содержание животных, что ведет к удорожанию себестоимости продукции.

Согласно нашим данным установлено, что с увеличением возраста доноров увеличивалось время инкубации, и уменьшалась степень образования монослоя первично-трипсинизированной культуры клеток почек новорожденных крольчат. От доноров 1–2 дневного возраста были получены первичные культуры клеток с образованием полного монослоя на 3–4 сут. культивирования, в то время как от доноров 30 дневного возраста степень образования монослоя к 14-м сут. культивирования была лишь 25%.

Таким образом, оптимальным возрастом доноров для получения первично-трипсинизированной культуры клеток почек кроликов считается – 1–2 дня.

#### **Методы получения первичной культуры клеток**

Для получения взвесей жизнеспособных клеток могут быть использованы практически все ткани пре- и постнатального периода жизни человека и животных. Наиболее универсальным и достаточно эффективным способом дезагрегации различных тканей на дискретные клетки является их обработка протеолитическими ферментами. Оптимизация условий энзиматической обработки тканей (использование разных ферментов или смесей нескольких ферментов в комплексе с хелатными агентами, подбор температурного режима, pH растворов диспергентов, регулирование длительности, воздействуя диспергентов на исходную ткань и т.д.) позволяет существенно повысить выходы жизнеспособных клеток [16].

В подавляющем большинстве случаев для получения первичных культур клеток используют различные модификации стационарного и роллерного способов культивирования. Несмотря на низкую эффективность, только эти способы культивирования обеспечивают стабильное получение первичных культур-продуцентов из свежеизолированных взвесей клеток в производственных условиях.

Определяющим этапом при получении первичных культур клеток человека и животных является дезагрегация исходных тканей на дискретные клетки или небольшие клеточные конгломераты, способные к размножению в условиях *in vitro*. Выбор способа диссоциации определяется типом ткани, возрастом животного-донора, доступностью донорского материала. Применяемые в настоящее время методики позволяют получать взвеси жизнеспособных клеток практически из всех органов и тканей пре- и постнатального периода жизни человека и животных [17].

Диспергирование субстратов с помощью механической или химической обработки наиболее часто используют при работе с эмбриональными и ранними постнатальными тканями, а также при работе с малыми количествами исходного материала (биопсия) или в случаях, когда применение протеолитических ферментов нежелательно [18].

Самым распространенным способом дезагрегации тканей является обработка их протеолитическими ферментами в комплексе с механическим и/или химическим воздействием. Наиболее широко в качестве диспергента используют трипсин [19].

Однако вследствие высокой специфичности протеолитических ферментов к субстрату, трипсин неодинаково эффективен при дезагрегации различных тканей. Это послужило основанием для использования других протеолитических ферментов в качестве диспергентов. В сравнительных опытах по дезагрегации различных тканей с целью получения первичных культур клеток было показано, что некоторые ферменты более эффективны, чем трипсин [20].

Широко используют для ферментативного расщепления тканей коллагеназу. Этот фермент по сравнению с трипсином обеспечивает более щадящие условия дезинтеграции тканей и позволяет существенно повысить долю жизнеспособных клеток в первичных взвешях [21]. Но коллагеназа практически не используется в производственных условиях из-за высокой себестоимости.

Для получения максимально чистой популяции клеток в своих исследованиях мы использовали метод, основанный на различных адгезивных способностях клеток. Для этого смесь клеток, полученную в результате механической и ферментативной обработки ткани почек, заливали ростовой средой и культивировали 24 часа. Затем не прикрепившиеся клетки осторожно переносили в новые культуральные сосуды для дальнейшей селекции. Клетки первично-трипсинизированной культуры почки новорожденного кролика имели преимущественно эпителиоподобную и удлиненно веретенообразную форму.

### Выращивание вирусов в культурах клеток

В общих чертах эта процедура оказывается одинаковой для всех вирусов. Среду удаляют с клеточного монослоя и монослой промывают сбалансированными буферными солевыми растворами (СБСР) или фосфатно-солевым буфером (ФСБ) для удаления ингибиторов (антител), которые могут присутствовать в среде. Вирусные частицы suspendируются в небольшом количестве СБСР или ФСБ и адсорбируются клетками в течение 30–60 мин.

После этого солевые растворы заменяются свежей средой. Заражение вирусами культивируемых клеток вызывает характерные морфологические изменения клеток. Конечные дегенеративные клеточные процессы (цитопатогенный эффект, ЦПЭ) обнаруживаются только через несколько недель роста в присутствии вирусов, но в ряде случаев ЦПЭ обнаруживаются уже через 12 ч. Детали морфологических изменений оказываются различными в случае разных вирусов.

Анализируя литературные данные, стало известно, что перевиваемые линии клеток почек кроликов чувствительны к некоторым вирусам других видов

с.-х. животных [22]. Согласно нашим исследованиям, в которых герпесвирус типа I культивировался в многослойных культурах клеток почек новорожденных крольчат, с каждым последующим пассажем на клеточном монослое титр вируса возрастал и на третьем пассаже соответствовал  $Ig\ TCD\ 50/мл = 7,5 \pm 0,1$ . В то время как в культуре МДБК он был ниже, и соответствовал 7,25. Эти данные позволяют сделать заключение о том, что культура клеток почек новорожденных крольчат обладает более выраженной вирусрепродуцирующей активностью и имеет принципиальную возможность быть использованной для репродукции герпесвируса типа I.

Так же, согласно полученным нами данным, первичная культура клеток почек новорожденных крольчат обладает более выраженной вирусрепродуцирующей активностью в отношении вирусов ПГ-3 (парагрипп-3), вируса ВД-БС (вирусная диарея), чем первичная культура клеток эмбриона кролика и имеет принципиальную возможность быть использованной с целью накопления вирусной массы.

### Заключение

Развитие современной медицины и фармацевтики в значительной мере определяется наличием эффективных клеточных систем, позволяющих проводить эксперименты, осуществлять диагностику и биопроизводство с максимальным выходом продукции. В настоящее время продолжается широкое использование первичных культур клеток в различных областях медицины и биологии. Это диктует необходимость дальнейшего совершенствования способов получения и культивирования клеточных систем.

Использование первично-трипсинизированных культур эмбрионов коров для производства вакцин дорого и трудоемко, кроме того, велика вероятность контаминации вакцинного сырья микроорганизмами. Установлено, что полученная нами первично-трипсинизированная культура клеток почек новорожденных крольчат чувствительна к герпесвирусу типа I, вирусу парагриппа-3, вирусу ВД-БС КРС. При этом оптимальный возраст доноров для получения первично-трипсинизированной культуры клеток почек кроликов составляет 1–2 дня.

Следовательно, полученные данные указывают на возможность использования культуры клеток почек новорожденных кроликов для репродукции вирусов КРС с целью наработки вирусной массы в процессе производства вакцин для сельского хозяйства.

### Благодарности

*Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Мингалеева Р.Н., Соловьева В.В., Блатт Н.Л. и др. Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 8(2): 20-8.
2. Еремец В.И., Самуйленко А.Я., Еремец Н.К. и др. Совершенствование и стандартизация технологических процессов, методов контроля и управления качеством противовирусных вакцин. Ветеринарный врач 2011; 3: 4-7.

3. Condit R.C. Principles of virology. In: Field's virology. 4rd ed. Knipe, D.N., Howley P.M., editors. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 19-51.

4. Mak N., Leung C., Wei X. et al. Inhibition of RANTES expression by indirubin in influenza. Biochemical Pharmacology 2004; 67: 167-74.

5. Лашкевич В.А., Дзагуров С.Г. Научно-экспериментальные основы производства и контроля полиомиелитных вакцин. Москва; 1973.

6. Petricciani J. Historical background, objectives and overview safety of biological products prepared from mammalian cell culture. *Dev. Biol. Stand.* 1998; 93: 3-4.
7. Азаев М.Ш., Нетесов С.В., Бакулина Л.Ф. и др. Практическое пособие по работе с клеточными культурами. Арзамас; 2011.
8. Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T. et al. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS* 2004; 101(13): 4620-4.
9. Блажевич О.В. Культивирование клеток: Курс лекций. Минск: БГУ 2004.
10. Мосолов А.Н., Ганин А.Ф. Соединительная ткань в норме и патологии. Новосибирск: Наука; 1968.
11. Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И. и др. Получение первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. *Медицина сегодня и завтра* 2011; 1-2: 248-52.
12. Зуев В.В., Дудко Ю.С., Кушнир А.Т. Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии. Материалы научной конференции ВНИИВВиМ. Покров, 1992; С.20-2.
13. Hashimoto T., Ikeda H., Kitani H. Isolation and characterization of fetal bovine brain cells in primary culture. *Research in Veterinary Science* 2000; 69: 39-46.
14. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. Библионика. Москва; 2007.
15. Завьялова Г.Н. Экспериментальное обоснование промышленной технологии получения первичных культур клеток [диссертация]. Владимир; 1970.
16. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре. Москва: Компания Спутник; 2000.
17. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. Москва: Мир; 1983.
18. Ryan U., Mortara M., Whitaker C. Methods for microcarrier culture of bovine pulmonary artery endothelial cells avoiding the use of enzymes. *Tiss. Cell* 1980; 12(4): 619-35.
19. Mandache E., Moldeveanu E., Savi G. Ultrastructural and immunological features of isolated kupffer cells. *Eur. J. Cell Biol.* 1980; 1: 623-4.
20. Dobbs L., Geppert E., Williams M. et al. Metabolic properties and ultrastructure of alveolar type II cells isolated with elastase. *Biochim. & Biophys. Acta.* 1980; 3: 510-23.
21. Kanoza R., Brunette D., Purdon A. et al. Isolation and identification of epithelial-like cells in culture by a collagenase-separation technique. *In Vitro* 1978; 14(9): 746-53.
22. Пинаев Г.П., Полянская Г.Г., Сакута Г.А. и др. Каталог. Российская коллекция клеточных культур (РККК). Санкт-Петербург; 2004.
23. Плотникова Э.М., Кириллова Ю.М., Глаголева И.С. Подбор оптимальных условий роста первичной культуры клеток почек новорожденных кроликов. *Веткорм* 2012; 4: 42-3.

*Поступила: 21.08.2014*