

Система паспортизации перевиваемых клеточных линий, хранящихся в низкотемпературных банках

А.А. ЛАВРИК, Б.Т. СТЕГНИЙ, В.С. БЕЛОКОНЬ

Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, г. Харьков

Certification System for Recultured Cell Lines, Stored at Low Temperature Banks

A.A. LAVRIK, B.T. STEGNIY, V.S. BELOKON

Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkov

В серии технических докладов ВОЗ определены требования к линиям клеток, используемым в производственных и научно-исследовательских целях. Гарантом выполнения этих требований во всем мире стала система организации низкотемпературных банков клеток, где каждая культура должна иметь паспорт качества. Основными такими параметрами являются чистота от контаминирующих агентов, аутентичность и стабильность, однако методическая основа исследований этих параметров до сих пор не стандартизирована и не достаточна для полной оценки биологических параметров культуры.

Цель работы – совершенствование системы паспортизации перевиваемых линий клеток с использованием молекулярных и цитогенетических методов исследования.

Для индикации микоплазменной контаминации в сравнении с серологическими методами исследований в ИЭКВМ был внедрен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применение праймеров к роду *Mycoplasma* (AmpliSens, Россия) показало высокую чувствительность детекции микоплазменной контаминации с помощью ПЦР. Используемые в качестве контроля 4 вида микоплазм (*Mycoplasma inners*, *Mycoplasma gallinarum* B-733, *Mycoplasma* 2795 и *Acholeplasma laidlawii*) также подтвердили высокую специфичность метода ПЦР. Данными видами были экспериментально контаминированы перевиваемые линии клеток ВНК-21 и FLK-SBBL. С помощью ПЦР были успешно идентифицированы эти контаминанты, тогда как при серологическом методе был получен сомнительный результат, который зависел от количества микоплазм в исследуемой пробе.

При исследовании стабильности кариотипа перевиваемых клеточных культур, хранящихся в криобанке ИЭКВМ, использовали классический цитогенетический метод и метод учета митотического режима клеток, который с этой целью применялся в системе паспортизации культур впервые. Было исследовано 17 перевиваемых линий клеток, имеющих различное видовое происхождение (SPEV, PK-15-IECVM, PTP, LEK, MDBK, PT, MDCK, ВНК-21/ 2-17, ВНК clone 13/04, Vero, CV, NGUK, F-81, PO-2, PO-2/04, RK-13 и PS-FGM). В большинстве случаев наличие модального класса (группы) хромосом в клетках исследуемых культур прямо коррелировало с минимальным процентом патологических митозов (не выше 20% от делящихся клеток). Оба критерия свидетельствуют о стабильном кариотипе клеток. В то же время наблюдались исключения, когда в культурах PTP и MDCK наличие модальной группы хромосом сочеталось с повышенным количеством патологических митозов (>20%).

Таким образом, было показано, что для оценки стабильности кариотипа клеточных линий применение одного классического цитогенетического метода недостаточно, поэтому необходимо использовать с этой целью метод оценки митотического режима клеток. Также доказана эффективность метода ПЦР для идентификации микоплазменной контаминации клеточных культур, что требует его внедрения в систему паспортизации клеток.

In the series of the WHO technical reports there were defined the requirements to cell lines, used in production and for scientific-research purposes. The guarantee of meeting these requirements all over the world became the system for establishing low temperature banks of cells, where the quality for each culture should be certified. These main parameters are such as: purity from contaminating agents, authenticity and stability, but the methodical grounds for studying these parameters have not been standardized yet and are insufficient for a complete estimation of culture biological parameters.

This research was targeted to improve the certification system for recultured cell lines with using molecular and cytogenetic research methods.

The PCR method was introduced into the Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine to indicate mycoplasma contamination in comparison with serological research methods. Applying the primers to *Mycoplasma* genera (AmpliSens, Russia) has demonstrated a high sensitivity to mycoplasma contamination using PCR. Used as the control 4 mycoplasma species (*Mycoplasma inners*, *Mycoplasma gallinarum* B-733, *Mycoplasma* 2795 and *Acholeplasma laidlawii*) confirmed a high specificity of PCR method as well. Recultured ВНК-21 and FLK-SBBL cell lines were experimentally contaminated with these species. These contaminants were successfully identified using PCR, meanwhile at a serological method a controversial result, depending on mycoplasma amount in studied sample was obtained.

When investigating the karyotype stability of recultured cell cultures, stored at the cryobank of Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine there were used the standard cytogenetic method and that for counting mitotic cell regimen, which was firstly applied with this aim in certification system. We investigated 17 recultured cell lines, having different specific origin (SPEV, PK-15-IECVM, PTP, LEK, MDBK, PT, MDCK, ВНК-21/ 2-17, ВНК clone 13/04, Vero, CV, NGUK, F-81, PO-2, PO-2/04, RK-13 and PS-FGM). In the majority of cases the presence of modal class (group) of chromosomes in cells of studied cultures directly correlated with a minimum percentage of pathological mitosis (not higher than 20% of dividing cells). Both criteria testify to a stable cell karyotype. At the same time the exclusions, where in PTP and MDCK cultures the presence of modal group of chromosomes was combined with an increased amount of pathological mitoses (>20%).

Thus, the application of one standard cytogenetic method has been demonstrated to be insufficient for estimating karyotype stability of cell lines, therefore using the method of cell mitotic regimen evaluation for this purpose is needed. The PCR method efficiency to identify mycoplasma contamination in cell cultures is also proved, that requires its introduction into the system of cell certification.