

Инактивацию реовируса необходимо проводить за кінцевої концентрації 0,1%, експозиції 24 години за температури 37,5 °С.

#### Список літератури

1. Изучение условий инактивации реовируса птиц [Текст] / В.И. Шкиря, С.К. Старов, А.Б. Сарбасов., Н.П. Филиппова // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику : материалы конф. мол. ученых. — Владимир, 2000. — С. 12–14. 2. Brown, F. The use of acetylenimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines [Text] / F. Brown, N. St. G. Hyslop, J. Crick, A.W. Morrow // J. Hyg. Camb. — 1963. — Vol. 61, № 3. — P. 337–344. 3. Вирусные болезни животных [Текст] / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. — М.: ВНИТИБТ, 1998. — С. 183–198. 4. Сергеев, В.А. Инактивированные вакцины [Текст] / В.А. Сергеев // Вирусные вакцины. — К, 1993. — С. 150–181. 5. Doel, T.R. Inactivation of viruses produced in animal / T.R. Doel // Animal Cell Biotechnology. — London, 1985. — Vol. 2. — P. 124–149.

### INACTIVATION OF THE STRAINS 1733 AND BR-06 REOVIRUS, ISOLATED FROM SICK WITH TENOSYNOVITE HENS

Nikolaenko Yu.Yu.

Poultry Research Institute of UAAS

*It has been worked out the regime of inactivation of strains 1733 and Br-06 of the chicken reovirus, which will be used for constructing of inactivated vaccines. It has been established that the ethylamine at the concentration 0.1 % inactivates strains 1733 and Br-06 for 24 hours when the temperature is 37.5 °C.*

УДК 619:576.535

### ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ПАСПОРТИЗАЦИИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК

Ночевный В.Т., Ласкавый В.Н.

ГНУ Саратовская НИВС РАСХН, г. Саратов, Россия

*В статье обоснована возможность применения метода проточной цитометрии (ПЦ) для контроля пяти перевиваемых сублиний клеток по размерам, гранулярности, фазам клеточного цикла и апоптозу.*

*Экспериментально доказана прямая зависимость величины апоптоза с ростовыми свойствами и чувствительностью к модельным вирусам.*

Основой эффективного производства противовирусных иммунобиологических препаратов (ИБП) является доступность, высокая чувствительность и стабильность свойств клеточного субстрата. Применение первичных культур клеток, как правило, не перспективно из-за дефицита и контаминации тканевого сырья и не экономично из-за трудоемкости производства биопрепаратов. Наиболее успешно в практике используют перевиваемые линии клеток (ПЛК), аттестованные в соответствии с требованиями отечественных и международных стандартов [1,2,3]. Необходимо отметить, что указанные методы контроля ПЛК достаточно трудоёмки и длительны в исполнении. Поэтому поиск более перспективных методов контроля качества культуральных моделей (КМ), в особенности ПЛК гомологичного вида, сохраняемых в отечественных и международных коллекциях является своевременным и актуальным [4,5,6,7].

В последние десятилетия для этих целей широко используют достаточно эффективный, высокоскоростной экспресс-метод проточной цитометрии (ПЦ) и клеточной сортировки аналитические возможности которого весьма разнообразны и позволяют объективно оценить морфологические, физиологические и цитохимические показатели, изучить фазы клеточного цикла и структурные компоненты клеток, количественно определить поверхностные и внутриклеточные антигены и мембранные рецепторы, а также осуществить выделение и анализ клонов и кле-

точных фракций с целью их последующей стандартизации и применения в практике [8, 9, 10, 11].

Учитывая значимость КМ для производства и контроля ИБП представляло интерес оценить возможность и перспективы применения метода ПЦ для отбора, паспортизации и применения наиболее перспективных сублиний клеток в практике.

**Материалы и методы.** *Клеточные культуры.* В сравнительном аспекте изучены 4 вида ПЛК [VERO (4), RK-13 (2), СПЭВ (2), FLK (2)], полученные из многочисленных источников, указанных в таблице 1 и прошедшие ин-витро различное количество пассажей. Тест – культуры (ТК) хранились в криобанках России и мира в течение 10–34 лет и поддерживались ин-витро стационарным и роллерным методами в соответствии с требованиями паспортов. Предварительно монослойные культуры оценивали по ростовым свойствам, морфологии, контаминации микоплазмами и чувствительности к модельным вирусам [1,2,3,4].

*Вирусы.* Контроль активности сухих стандартных образцов (ССО) вакцинных штаммов Л-16 и Л-3 вирусов кори (ВК) и эпидемического паротита (ЭП), аттенуированного штамма Wistar RA27/3 и изолята С-44 вируса краснухи (ВКр) оценивали соответственно на ТК VERO и RK-13, а сублинии клеток СПЭВ испытывали в качестве субстрата для накопления штамма ВН-96 вируса трансмиссивного гастроэнтерита (ТГЭ) свиней. Хронически инфицированные КМ FLK оценивали в качестве субстрата для накопления вируса лейкоза (ВЛ) КРС.

**Контроль ТК методом ПЦ.** *Фиксация и окрашивание клеток.* Клетки ТК в активной фазе роста отделяли от субстрата общепринятыми диспергантами. Изолированные клетки ПЛК трижды отмывали от ростовой питательной среды фосфатно-буферным раствором (ФБР) с рН 7,2, фиксировали 70% этанолом в течение 3 часов при 4 °С, затем трижды отмывали от фиксатива ФБР с 40 мг/мл иодита пропидия и 0,5 мг/мл рибонуклеазы, выдерживали 60 мин. Тест – культуры были охарактеризованы по размерам, гранулярности, фазам клеточного цикла и программированной клеточной гибели (ПКГ) – апоптозу на лазерном проточном цитофлуориметресортере «EPICS<sup>®</sup> Elite (Coulter, USA), оборудованном аргоновым лазером CYONICS (Uniphase, USA) с длиной возбуждения 488 нм и мощностью луча 15 мВт. Метод ПЦ апробирован и зарегистрирован МЗ РФ за №2000/257 от 26.06.2000 г.

*Размеры интактных клеток* оценивали по рассеиванию света под малым углом (0–10°) в Coulter/ USA/ в сравнении со стандартными микросферами, имеющими диаметр 10 мкм.

*Гранулярность* неокрашенных клеток определяли по рассеянию света под углом 90°. Образцы культур анализировали с использованием барьерных фильтров 488 ВК, 488 ВР, 488 DL. Для дискриминации частиц, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, в программу анализа вводили логические ограничения.

*Распределение ДНК по фазам клеточного цикла и апоптозу.* Исследовали сублинии клеток за 24 часа до образования монослоя. Популяцию изолированных клеток, окрашенных иодидом пропидия, исследовали в интегральном канале флуоресценции с использованием барьерных фильтров 488 К, 488 ВР, 625 ВР. Для удаления из популяции клеток агрегатов в программу были введены логические ограничения. Клетки, содержащие ДНК меньше 2п считали апоптотическими. Полученные гистограммы подвергли математической обработке с использованием программ EXPO-32 (Beckman-Coulter, USA) Multi Cycle (Phoehix Flow Systems, USA).

**Результаты и обсуждение.** Предварительные испытания показали, что изученные сублинии клеток, полученные из различных источников, имеющих индивидуальную историю поддержания ин-витро и длительности хранения в криобанках, существенно различались по ростовым свойствам, контаминации микоплазмами, а монослойные культуры, даже гомологичного происхождения – морфологически, в тоже время по кариологическим показателям, количеству зон локализации лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и их электрофоретической подвижности КМ соответствовали их видовому происхождению.

С целью, сохранения ростовых свойств и вируса редуцирующей активности исследуемые сублинии клеток, за исключением VERO B, RK-13X, СПЭВ-а, RK-13E, были деконтаминированы при помощи Энрофлона –К [12]. Эффект элиминации микоплазм из клеток ТК был достигнут благодаря оптимальному соотношению дозы ФЛХ, минимальной посевной концентрации клеток, длительности пассирования культур и подтвержден микробиологическим методом (ММ) и в ПЦР, а так же результатами 10-ти кратного пассирования сублиний с общепринятыми антибиотиками. Из деконтаминированных сублиний клеток были изготовлены эталонные (по 20-30 ампул) и рабочие (по 75-120 ампул) криобанки с концентрацией 4,2-8,6 млн/мл клеток. После размораживания изолированные клетки сохраняли жизнеспособность на уровне 79-94 %, обладали адгезивными и ростовыми свойствами и формировали монослой в аналогичные с контролем сроки. Морфология КМ восстанавливалась через 2-3 пассажа.

Контроль чувствительности КМ показал, что наиболее перспективными как для определения активности, так и накопления вирусов кори, ЭП, краснухи, лейкоза КРС и ТГЭ свиньи являются, соответственно, сублинии VERO WHO, RK-13X, СПЭВ-б, FLK-б.

Указанные ТК были представлены, в основном, эпителиоподобными клетками с четко выраженными границами, которые интенсивно пролиферируют и обеспечивают стабильно высокое накопление клеточной биомассы и вирусов. Напротив клетки сублинии VERO – В, характеризующиеся высокими ростовыми свойствами и характерной морфологией, оказались непригодными для контроля активности, в особенности вируса ЭП, вследствие неспецифичности ЦПД, а учет результатов титрования вируса краснухи методом бляшек был затруднен из-за значительных морфологических изменений в ТК FLK-E.

В параллельных экспериментах оценивали возможность и перспективность применения метода ПЦ как для паспортизации отдельных сублиний клеток, так и КМ гомологичного вида, полученных из различных источников. Сравнительное изучение КМ методом ПЦ показало (таб.1, рис.1), что жизнеспособность, размеры и показатели гранулярности цитоплазмы не окрашенных клеток варьируют в широких пределах, однако для рекомендуемых ТК они были минимальными. Максимальные значения указанных показателей свидетельствуют о длительности и неадекватных условиях пассирования, а также о существенных нарушениях процессов пролиферации и появления в популяции ТК большого процента аномальных и апоптотических клеток.

Изучение гистограмм распределения клеток по фазам клеточного цикла показывает, что за исключением VERO WHO сублинии RK-13X, СПЭВ-б, FLK-б оказались значительно более перспективными для практического использования. Это обусловлено как относительно низкими значениями размеров и гранулярности популяции клеток, так и более высоким процентом пролиферирующих клеток, в том числе в фазах G2+M, S+G2+M и оптимальным (не выше 1,95) соотношением G 2/ G1.

Наиболее значимым показателем ПЦ определяющим перспективность использования сублиний клеток в практике является ПКГ-апоптоз. Этот показатель характеризуется сморщиванием клеток, фрагментацией ДНК, дезинтеграцией клеточной мембраны и образованием апоптотических телец с минимальным содержанием (< 2n) нуклеиновой кислоты.

Анализ гистограмм распределения клеток в зависимости от содержания ДНК свидетельствует о том, что апоптоз является критическим показателем, по величине которого можно достоверно судить о перспективности КМ. В частности, в предлагаемых для практики ТК показатели апоптоза были оптимальными и не превышали предельно допустимого (не более 20 %) уровня. Снижения уровня апоптоза в ТК предназначенных для репродукции вирусов или синтеза целевого продукта возможно, что повышает эффективность применения КМ. В частности на модели наиболее чувствительной и наименее «качественной» сублинии VERO WHO показана возможность коррекции ростовых свойств и снижения уровня апоптоза с 34,8 до 30,1 %

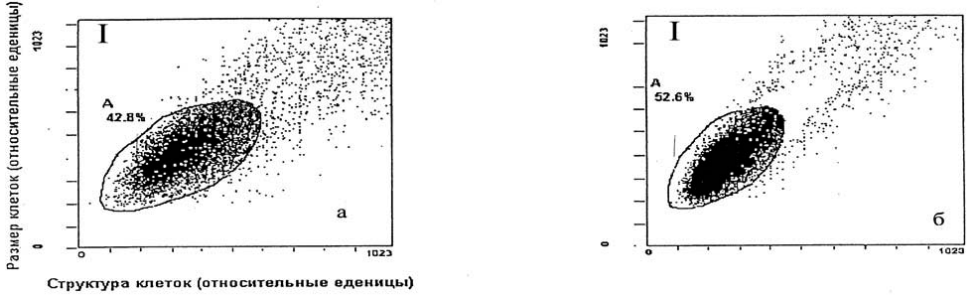
**Таблица. 1** – Сравнительная оценка качества сублиний перевиваемых культур клеток методом проточной цитометрии

Показатели	Наименование тест–культур клеток																			
	Почка эмбриона обезьяны						Назначения показателей													
	Ветро В	Ветро А	Ветро К	Ветро WHO	РК-13Х	РК-13Е	FLK-а	FLK-б	СПЭВ – а	СПЭВ – б	Почка эмбриона свиной	Почка эмбриона свиньи								
Источник получения	Россия ИВ им. В.И. Иванова-кого	Англия School of Tropical medicine and Hygiene	Канада	Англия ЕСАСС	Хорватия	Англия ЕСАСС	Россия ВНИИЗЖ	Россия ВНИИВ-ВиМ	Россия ВГНКИ	Россия ВНИИВ-ВиМ	Россия ВНИИВ-ВиМ	Россия ВНИИВ-ВиМ								
Пассаж	175	162	250-300	140	70-75	50-55	5	20	305	184										
Индекс пролиферации (ИП)	3-5	4-6	2-3,5	3-5	3,7-4,5	4,5-5,2	3-5	5-6	4-5	5-6										
Цитометрический анализ клеточного цикла																				
Размер клеток (мм)	10,6 + 2,85	12,7+2,85	18,3+3,15	18,3+3,15	11,95+3,1	10,51+2,34	24,8+6,1	22,9+6,1	18,8+2,1	15,8+2,5										
Гранулярность (МЕАМ)	288,3	336,0	452,4	469,2	565,8	497,6	503	465	461	379										
Апоптоз (%)	16,8	16,3	46,5	34,8	23,7	83,3	17,5	8,6	41,8	3,6										
S	10,9	15,1	8,3	8,6	20,1	23,3	5,0	10,1	22,7	3,3										
G 2/ G1	1,875	1,884	1,995	1,902	1,946	2,054	1,963	1,942	1,945	1,917										
Апоптоз (%)	12,9	18,4	8,3	10,6	24,1	23,6	17,7	28,3	24,0	10,3										
Показатели G1+G0	87,2	81,6	5,3	91,7	8,7	89,3	5,5	75,9	7,4	76,4	7,0	82,2	5,4	71,7	4,8	76,0	6,6	89,7	4,9	
G2+M	2,0	6,6	3,3	5,4	0	7,2	2,0	11,7	4,0	8,8	0,8	12,3	12,7	5,5	18,2	5,3	1,3	3,5	7,0	5,1
Фазы клеточного цикла	Шт. Л-16 (lg ТЦД <sub>50/мл</sub> )																			
Чувствительность культуральной модели	Шт. RA27/3МВ КР (БОЕ/мл)																			
	Шт. Л-6 ВЭП (lg ТЦД <sub>50/мл</sub> )						Шт. С-44 В КР (БОЕ/мл)						Шт. ВН-96 ВТГЭС (ОП ТФ ИФА)							
	6,42+0,09	6,31+0,09	6,20+0,07	6,37+0,07	4,5-6,0·10 <sup>3</sup>	-	0,5-0,6	0,4-0,5	6,89±0,19	7,28±0,25										
6,37+0,17	6,20+0,16	6,31+0,09	6,31+0,09	4,4-5,2·10 <sup>6</sup>	-															

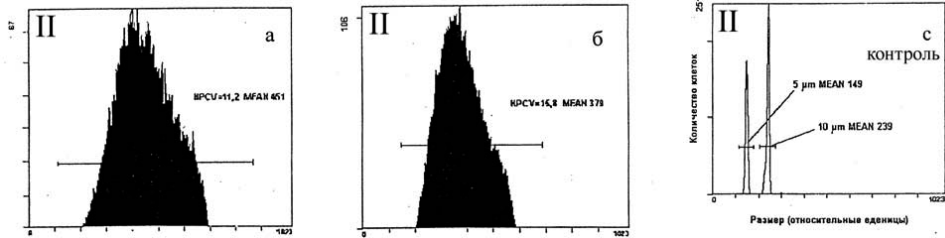
Обозначения: РС – позитивные клетки (%) по фазам клеточного цикла;

CV – коэффициент вариации

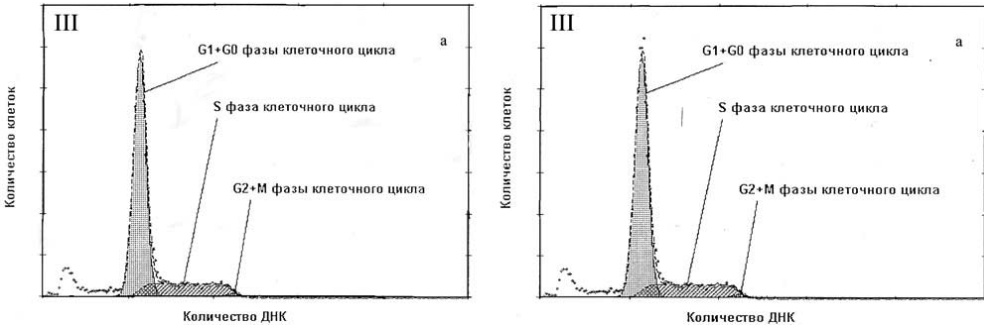
## Структура и размеры клеток



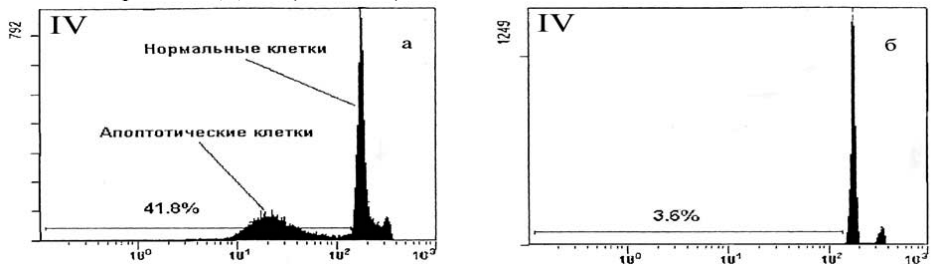
## Гранулярность (MEAM) цитоплазмы клеток



## Фазы клеточного цикла



## Содержание ДНК (апоптоз) клеток



**Рис. 1.** Распределение клеток сублиний СПЭВ (а) и СПЭВ (б) в зависимости от структуры (I), гранулярности цитоплазмы (II), фаз клеточного цикла (III) и содержания ДНК (IV) – апоптоза

за счет дополнительного внесения в состав ростовой питательной среды фетальной сыворотки от 2 % до 4 % и использования клеток в период логарифмического роста с жизнеспособностью не менее 96 %.

**Выводы.** Таким образом, в результате экспериментальных исследований для паспортизации ПЛК апробирован и рекомендуется для практического применения достаточно перспективный экспресс-метод ПЦ, который позволяет получить статистически достоверные результаты о жизнеспособности, размерах, гранулярности, фазах клеточного цикла и апоптозе, а также позволяет сократить затраты рабочего времени на исследования в 15-20 раз. Необходимо также указать на равноценность и достоверность результатов паспортизации сублиний клеток, полученных общепринятыми способами [4, 6, 11] и методом ПЦ. С учетом полученных данных для контроля активности вакцинных штаммов вирусов кори, ЭП краснухи, производства культуральных антигенов лейкоза КРС и ТГЭ свиней отобраны и паспортизированы сублинии клеток с максимальной чувствительностью и высоким ростовым потенциалом. Следует также отметить, что апоптоз является критическим показателем, по величине которого можно судить о практической значимости КМ [13, 14, 15]. В наших исследованиях экспериментально подтверждена прямая зависимость величины апоптоза и качества ТК. Этот факт указывает на возможность и перспективность применения метода ПЦ для оценки и выбора наиболее перспективных КМ, особенно гомологичного вида, а также позволяет рассматривать апоптоз в качестве объективного, практически значимого показателя при выборе наиболее качественного клеточного субстрата как для целей диагностики, так и производства иммунобиологических препаратов, отвечающих требованиям ВОЗ.

#### Список литературы

1. Требования к перевиваемым линиям клеток, используемым для производства биологических препаратов // Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов (Серия технических докладов ВОЗ №745). — М., 1988. — С. 85-89.
2. Методические указания (РД 42-28-10-89) по аттестации перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов. — М., 1989.
3. Методические рекомендации о порядке аттестации и поддержания перевиваемых линий клеток, используемых для культивирования вирусов производства иммунобиологических препаратов ветеринарного назначения // Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины (РАСХН). — М., 2008. — 4.4. — С. 422-438.
4. Грачёв, В.П., Петруччиани, Д.С. Оценка перевиваемых клеточных линий как субстрата для производства биологически активных веществ // ЖМЭИ. — 1987. — №2. — С. 46-51.
5. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии). Дьяконов Л.П. и др. — М.: Компания «Спутник», 2000. — 400 с.
6. Султанова, З.Д., Куликова, К.С., Гуревич, Э.Б. Сравнительная морфологическая, культуральная и вирусологическая характеристика перевиваемых линий клеток // Вопр. вирусол., 1968. — №3. — С. 291-298.
7. Голубев, Д.Б., Соминина, А.А., Медведева, М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. — Ленинград, Медицина, 1976. — 224 с.
8. Мораска, Л., Эрба, Э., Проточная цитометрия // Культура животных клеток. Методы. — М.: Мир, 1989. — С. 182-213.
9. Полетаев, А.И., Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине. Общие проблемы физико-химической биологии. Итоги науки и техники ВИНТИ. — М., 1989. — Т.12. — С. 3-87.
10. Chapiro, N.M. Practical flow Cytometry. New-York: Chiches ter Brisbane / Toronto. Singapur, 1995. — Wiley Liss, 1995. — 542 p.
11. Ночевный, В.Т., Колышкин, В.М., Попов, В.Ф. Перспективы использования метода проточной цитометрии для стандартизации перевиваемых линий клеток // Мат. Междун. Мауч. Конф.-Владимир, 2003. — С. 498-500.
12. Ночевный, В.Т., Виолин, Б.В., Карпухина, О.Г. Энрофлон—К — эффективное средство профилактики микоплазменной и бактериальной инфекции // Аграрная наука, 2003. — №6. — С. 13-16.
13. Фильченков, А.А., Стойка, Р.С. Апоптоз и рак. — Киев: Морган. — 1999. — 184 с.
14. Колышкин, В.М., Ночевный, В.Т. Апоптоз как фактор отбора и стандартизации перевиваемых линий клеток // Мат. XII Междун. Конф. и дискус. науч. клуба. II + ME 2004. — Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 1-10 июня 2004. — С. 186-188.
15. Колышкин, В.М., Ночевный, В.Т. Новохатский, А.С. Апоптоз клеток в культуре: особенности проявления и влияние на эффективность биотехнологического производства (Обзор) // ЖМЭИ. — 2005. — №6. — С. 99-105.

#### APPLICATION OF THE FLOW FLOW CYTOMETRY FOR CATEGORIZATION AND STANDARDIZATION OF CONTINUOUS CELL LINES

Nochevny V.T., Laskavy V.N.

Saratov Scientific Research Veterinary Station of the Russian Agricultural academy,  
Saratov, Russia

*The authors have proved the possibility of flow cytometry application for control of five continuous cell sublines by sizes, granularity, cell line phases, and apoptosis. Direct correlation between apoptosis level with growth properties and sensitivity to model viruses has been shown experimentally.*