

ПОДХОДЫ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ОСНОВЕ БАНКА - МУЗЕЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

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

Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций

Решение вопросов теоретической и прикладной вирусологии в существенной мере зависит от качественной характеристики используемых клеточных культур. Поддержание клеточных культур путем длительного пассирования приводит к выраженному изменению их основных характеристик вследствие неизбежного изменения состава и качества питательных сред и сывороток, условий и режима культивирования. Происходят и более глубокие сдвиги в характеристике клеток вплоть до изменения кариотипа и видовой принадлежности культур вследствие их возможной контаминации. Поэтому задача сохранения используемых клеточных культур с неизменными биологическими характеристиками в течение длительного времени является актуальной, а постановка вопроса о создании отраслевых стандартов клеточных культур с регламентированными биологическими характеристиками, определяющими качественный уровень проводимых исследований, вполне закономерна (1,2,3,9).

Разработка условий получения и хранения стабилизированных линий клеток, проводимая в ЕНИИВИ в течение нескольких десятилетий, предопределила также изучение криоустойчивости клеточных культур с целью выбора оптимальных условий их консервации, что послужило основой для последующего внедрения системы обеспечения вирусологических лабораторий России стабилизированными клеточными культурами (4,5).

Создание низкотемпературного фонда клеточных культур для этих целей проводилось на основе:

- а) анализа влияния сверхнизких температур (-196°C) на биологические свойства клеток;
- б) оценки обратимости криогенных повреждений;
- в) выбора критериев контроля клеток при отработке оптимальных режимов криоконсервации клеточных культур. Логическим завершением этого явилась отработка условий транспортировки клеток на дальние расстояния (6).

В процессе подготовки клеток для использования в вирусологических исследованиях особое значение придавалось контролю их на микоплазма - инфекцию. Микоплазма - инфекция поражает переносимые клеточные культуры в 57 - 92% случаев. Латентная инфекция клеток не сопровождается видимыми морфологическими изменениями, но может влиять на характер роста культур, выражаясь в замедлении роста и ухудшении адгезивной способности клеток. Острая микоплазма - инфекция вызывает резкое закисление среды роста, дегенерацию клеток и их раннее отторжение от стекла. Происходит изменение и их морфологии - зернистость цитоплазмы, кариорексис и пикноз ядер.

Деконтаминация клеток от микоплазм приводит к нормализации культуральных свойств и морфологии клеток, что убедительно показали электронно-микроскопические наблюдения, повышение митотической активности и нормализация процесса деления клеток в культуре. Для деконтаминации клеточных культур от микоплазм использовали традиционные методы, существенно модифицированные применительно к нашим условиям работы. Подавление роста микоплазм антибиотиками показало, что оптимальным сочетанием является использование канамицина (1000 мкг/мл) с тетраолеаном (25 мкг/мл) или канамицина (1000 мкг/мл) с линкомицином (250 мкг/мл). Антибиотики добавляли в суспензию клеток при их

пересеве в течение 3-5 пассажей, с двукратной сменой среды со свежей порцией антибиотиков в течение каждого пассажа. Последующее культивирование клеток проводили без антибиотиков. Положительные результаты получены также при использовании оливомицина: монослой трех суточной культуры заливали раствором оливомицина в дистиллированной воде в концентрации 200 - 300 мкг/мл, выдерживали при комнатной температуре 5 - 7 мин. Раствор сливали, а монослой двукратно промывали средой 199 и заливали средой роста. Смену среды проводили ежедневно.

Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток культуры ткани дает представление не только о наличии микоплазм, но и об изменении ультраструктуры клетки в условиях инфекции. Контаминация клеточных культур вирусами выявляется с большим трудом и может длительное время оставаться незамеченной. Использование метода смешанного культивирования исследуемых клеток с клетками делает их чувствительными к различным вирусам. Кроме того, использование реакции гемадсорбции с эритроцитами кур, морской свинки и О-группы человека является достаточно информативным. Эффективны также методы электронной микроскопии и иммунофлуоресценции. Факт выявления посторонних вирусов в культурах клеток нами был отмечен только в случае заноса их с сывороткой крови крупного рогатого скота, используемой для поддержания клеточных линий. Онкорнавирусы типов А, С или В были выявлены в 90% исследуемых культур.

Поиски путей стабилизации свойств перевиваемых клеток привели к необходимости выбора оптимальных условий их длительной консервации, наиболее перспективным из которых явился метод хранения культур в жидком азоте при -196°C . Наши эксперименты показали, что криоустойчивость клеток в значительной степени обусловлена морфофизиологическими особенностями культуры.

Поэтому для создания фонда клеточных культур были использованы клоповые линии клеток, свободные от микоплазмоконтaminантов и посторонних вирусов, что является одним из обязательных условий стабилизации биологических характеристик клеток. В период адаптации клеток после длительного хранения в жидком азоте происходило повышение пролиферативного пула и интенсивности генерационных процессов восстановленной культуры за счет более высокой криоустойчивости клеток стволовой линии. В качестве критериев оценки криоустойчивости клеток в последующем были использованы данные их ультраструктурной характеристики, показатели интенсивности клеточного деления, продолжительность генерационного цикла и кариотипическая характеристика популяции (7).

Для замораживания, как правило, использовали культуру 4-5 - суточного возраста. Клетки снимали 0,02% раствором версена "шадящим" способом, без центрифугирования; ресуспендировали в среде культивирования из расчета до 2 млн. клеток в 1 мл, добавляя до 10% нативной сыворотки крови крупного рогатого скота и стерильного глицерина или диметилсульфоксида (5-10%). Приготовленную взвесь клеток разливали по 3 мл в ампулы БЦЖ, после запайки выдерживали 2 ч. при $+4-6^{\circ}\text{C}$, а потом замораживали по оптимальной программе.

Восстановление клеток после криоконсервации проводили при $+37^{\circ}\text{C}$, а оттаявшую взвесь клеток переносили в посевные матрасы с обычной для этой культуры средой роста и помещали в термостат для выращивания. Восстановленные клетки были жизнеспособными и обладали высокой пролиферативной активностью, образуя монослой на третьи-четвертые сутки роста уже в первом пассаже. Ультраструктура размороженных клеток резко отличается от контрольных, не подвергавшихся замораживанию: хроматин образовывал хлопья на фоне про-

светленного матрикса ядра, ядерная мембрана местами расслаивалась, цитоплазма была вакуолизована, митохондрии - набухшие с фрагментированными кристами, а рибосомы свободно располагались в матриксе цитоплазмы. Эти явления обратимы. Клетки третьего-пятого пассажей уже идентичны исходной культуре. Как показали наши исследования, чувствительность клеточных линий к вирусам ЕСНО, Коксаки А и В, респираторно-синцитиальному и парагриппозным вирусам, аденовирусам и арбовирусам в процессе длительного хранения при -196°С практически не изменялась. Создание низкотемпературного фонда клеточных культур, периодический контроль и пополнение его, а также широкое внедрение способа транспортировки клеток на дальние расстояния послужили основой обеспечения практических вирусологических лабораторий необходимыми для их работы клеточными культурами.

В настоящее время для обеспечения работы вирусологов коллекция клеточных культур низкотемпературного банка-музея ЕНИИВИ располагает десятками штаммов и линий клеток, паспортизованных согласно рекомендациям Всероссийской ассоциации клеточных культур (8). Для успешного функционирования коллекции и обеспечения ее взаимодействия с практической службой необходима разработка и внедрение отраслевой программы, учитывающей интересы каждого из потенциальных потребителей клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Анджапаридзе О.Г., Гаврилов В.И., Семенова В.Ф., Степанова Л.Г. // Культура тканей в вирусологических исследованиях. М.: 1962.
2. Вахтин Ю.Б. // Генетика соматических клеток. Л.: 1974.
3. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Р. // Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. Л.: 1976.
4. Глинских Н.П. и др. // Паспорт-каталог стабильных клеточных линий и штаммов низкотемпературного банка-музея. Свердловск, 1979.
5. Глинских Н.П., Зусман Ф.Я., Устьянцев В.П., Курумчина С.Г. // Выбор критериев оценки криоустойчивости клеточных культур, длительно сохраняемых при температуре жидкого азота: "Развитие и применение криогенной техники в медицине", М., 1980, С. 30-31.
6. Глинских Н.П., Зусман Ф.Я., Колесникова Г.Г. и др. // Методические рекомендации по получению, контролю и транспортировке клеточных культур, используемых в практике вирусологических исследований. Свердловск: 1984.
7. Глинских Н.П., Устьянцев В.П., Колесникова Г.Г. // К вопросу оценки биологических характеристик перевиваемых клеточных культур, подвергнутых криоконсервации/. В кн. "Проблемы стандартизации клеточных культур", М.: 1986.
8. Специализированная коллекция постоянных клеточных линий позвоночных ЕНИИВИ. Инф. бюллетень "Клеточные культуры" Вып 12, С.22 - 28. Санкт-Петербург, 1997.
9. Nelson-Rees W. A., Flandermeyer R.R., Nanthorne P.K. // Science, 1974, v. 184, P.1093.

Нина Поликарповна Глинских,

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор ЕНИИВИ