

Сусский Е.В., кандидат ветеринарных наук*

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

**Армавирская биофабрика, г.Армавир, Краснодарский край*

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»

г.Минск

ОЦЕНКА СУБЛИНИЙ КЛЕТОК MDBK ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ПАРАГРИППА-3 И ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ВВЕДЕНИЕ

Промышленное производство вакцин и гипериммунных сывороток для активной и пассивной иммунизации животных против вирусных инфекций предусматривает накопление вирусной массы. При этом для их накопления используются культуры клеток и развивающиеся куриные эмбрионы. Для культивирования вирусов парагриппа-3 (ПГ-3) и инфекционного ринотрахеита (ИРТ) крупного рогатого скота в настоящее время широко используются различные культуры клеток: 1 первичные (почки эмбрионов коров - ПЭК, тестикулов бычка – ТБ), 2 перевиваемые – почки теленка (ПТ, ПТ-80 –Таурус, MDBK), трахеи теленка, легких теленка и т.д. Особенно активно вирус накапливается на перевиваемой линии клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK. Перевиваемая линия клеток почки бычка (MDBK – *Bos taurus*) получена в Калифорнийском университете в 1957 г S.H. Madin, N.V. Darby. Тест-культура (ТК) на уровне 88 пассажа депонирована в АТСС и ЕСАСС [1]. В Россию ТК поступила в 1984 г, поддерживается *in vitro* и сохраняется в жидком азоте в коллекциях ВНИИВВиМ (MDBK-Е) и ВНИИЗЖ (MDBK-В) в соответствии с требованиями паспорта.

Обоснование выбора сублиний клеток MDBK для производства и контроля антигенов парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (КРС) основывалось на высокой чувствительности данных клеток к вирусам, максимального титра вирусов [2].

Для оценки морфологических характеристик клеток в настоящее время используется проточная цитометрия и сортировка, с помощью которой производится быстрое измерение характеристик клеток, их органелл и возможности физического отделения субпопуляции клеток с заданными свойствами. Проточная цитометрия базируется на широком спектре цитохимических и флуоресцентных методов анализа как структурных компонентов (ДНК, РНК, белка) клеток, параметров клеточного цикла и морфоло-

гической характеристики популяции клеток. Метод отличается чрезвычайно высокой производительностью (анализируются от 1 тыс. до 1 млн клеток) и возможностью индивидуального анализа клеток, входящих в выборку.

Целью исследований было проведение кариологической оценки различных сублиний перевиваемых клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали производственные, вакцинные штаммы ПТК 45/86 и ТК-А/ВИЭВ вирусов парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Предварительно вирусы адаптировали в течение 3–5 пассажей к сублинии клеток MDBK. Активность вирусов оценивали при помощи микротитрования в ТК клеток MDBK на плашках. Гемадсорбирующие свойства вируса ПГ-3 определяли в РГА (реакции гемагглютинации) с использованием 0,5 %-ной суспензии эритроцитов морской свинки по общепринятой методике.

При работе с клеточными культурами использовали среды Игла MEM, Игла DMEM, ГЛА на растворе Хенкса (рН 7,2-7,4); фосфатно-буферный раствор (ФБР) рН 7,2-7,4; 3%-ный раствор глутамина, диметилсульфоксид (DMSO); 0,25%-ный раствор трипсина и 0,02%-ный раствор версена; сыворотки крови (СК): фетальная фирмы Sigma (USA), крупного рогатого скота и телят.

При аттестации и паспортизации сублиний клеток оценивали культуральные, цитоморфологические, кариологические показатели, чувствительность к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и контаминацию тканевых культур микоплазмами и вирусами в соответствии с общепринятыми методами [3,4].

Методом проточной цитометрии были охарактеризованы прошедшие 30 и 43 пассажа после криоконсервирования сублинии клеток MDBK-Е и MDBK-В предназначенные для серийного пассирования вирусов ПГ-3 и ИРТ по следующим показателям:

- размеры клеток ;
- гранулярность;
- распределение ДНК по фазам клеточного цикла;
- программированная клеточная гибель - апоптоз.

Для цитометрического анализа сублиний клеток MDBK сублинии MDBK-Е и MDBK-В выращивали в стационарных условиях в течение 48 часов при температуре 37⁰С. Клетки отделяли от субстрата 0,02%-ным раствором версена (500 мл) с 50 мг химопсина. От ростовой ПС клетки трижды отмывали с использованием центрифугирования (7 мин, 450 g) в 3 мл охлажденного фосфатно-буферного раствора (ФБР) с рН 7,2, содержащего 0,15 М NaCl (ФБР). Осадок клеток фиксировали 70% этанолом в течение 3-х

часов при температуре 4⁰С. Зафиксированные клетки трижды отмывали от фиксатива центрифугированием (7 мин, 450 g) в 3 мл охлажденного до 4⁰С ФБР. Затем осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл ФБР, содержащем 40 мг/мл иодита пропидия (Calbio-chem) и 0,5 мг/мл рибонуклеазы (Sigma, USA). После 60 мин контакта клетки анализировали методом проточной цитометрии.

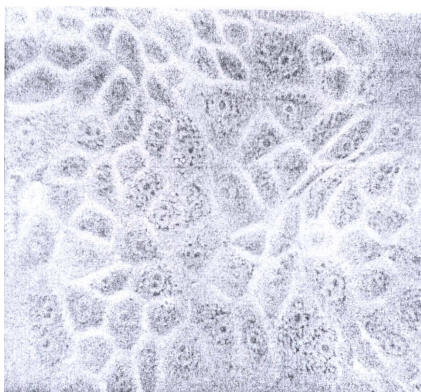
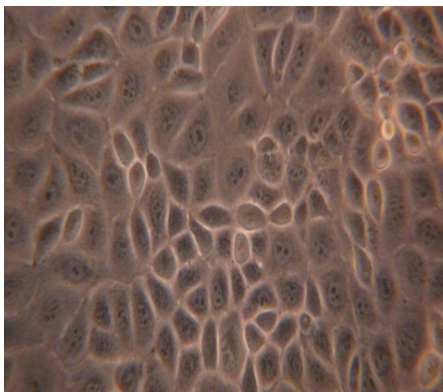
Анализ не менее 10⁶ клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B проводили на лазерном проточном цитофлуориметре-сортере EPICS «Elite» (Coulter, USA), оборудованном аргоновым лазером CYONICS (Uniphase, USA) с длиной волны возбуждения 488 нм и мощностью луча 15 мВт. Полученные гистограммы подвергали математической обработке с использованием программ EXPO 32 (Beckman-Coulter, USA) и Multi Cyse (Phoenix Flow Systems, USA). Цитометрический метод оценки клеток апробирован и зарегистрирован Министерством здравоохранения России за № 2000/257 от 26 июня 2000 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований экспериментально установлено, что сублинии клеток MDBK-E (ВНИИВВиМ) и MDBK-B (ВНИИЗЖ) существенно различались по культуральным, цитоморфологическим и карриологическим показателям, уровню контаминации и чувствительности к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита.

Тест-культура MDBK-E представлена мелкими эпителиоподобными клетками с четко выраженными границами. Цитоплазма клеток не зернистая, интерфазные ядра округлой формы содержат 1-4 ядрышка. Напротив, клетки сублинии MDBK-B были более крупными, зернистыми с незначительной вакуолизацией цитоплазмы. Цитопатических изменений в монослойных ТК на протяжении 10 суток наблюдения не установлено (рисунок 1).

Анализ метафазных пластинок сублиний MDBK-E и MDBK-B выявил, что число хромосом в клетках ТК колеблется соответственно от 43 до 58 и от 49 до 104, а модальное число представлено 51 и 52 хромосомами, составляющими в популяции 30 и 58% (таблица 1, рисунок 2). В кариотипе сублинии клеток MDBK-E кроме того, выявлены две маркерные хромосомы - большой мегацентрик и большая субмегацентрическая хромосома - характерные для линии MDBK-NBL1 из американской коллекции (ATCC) клеточных культур.



Примечание – микрофото, ок. x 10, об X 90, нативные препараты

Рисунок 1 – Цитоморфологическая характеристика сублиней клеток MDBK-ECACC (А) и MDBK-ВНИИЗЖ (В)

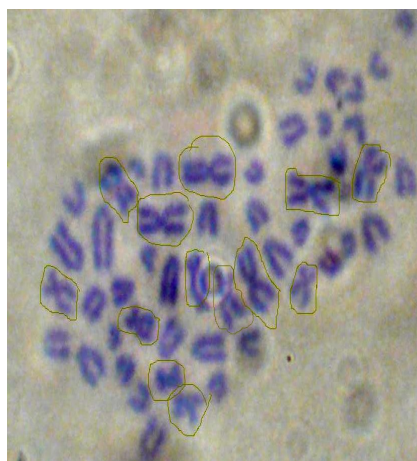
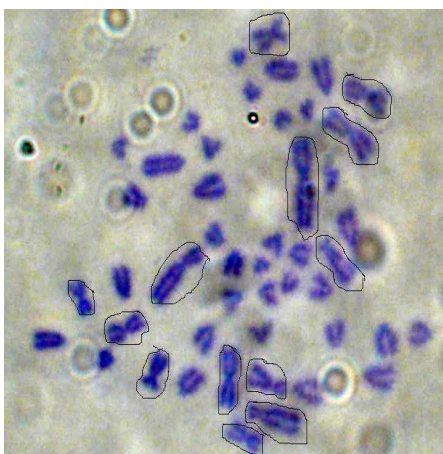


Рисунок 2 – Кариотипы сублиней клеток MDBK-ECACC (А) и MDBK-ВНИИЗЖ (В)

В таблице 1 приведены данные культуральных и цитометрических показателей сублиней клеток MDBK методом проточной цитометрии.

Таблица 1– Сравнительная характеристика культуральных и цитометрических показателей сублиний клеток MDBK методом проточной цитометрии

Показатели	Значение показателей		
	Наименование тест-культур		
	MDBK-E	MDBK-B	
Источник получения	Англия ЕСАСС (Е)	ВНИИЗЖ (В)	
Культуральные свойства			
Пассаж	30	43	
Сроки образования монослоя	48	48–72	
Индекс пролиферации (ИП)	3–5	2–3	
Морфология	Клетки мелкие, эпителиоподобные с четкими границами. Цитоплазма не зернистая. Ядра округлой формы с 1–4 ядрышками.	Клетки более крупные эпителиоподобные, зернистые со слабо выраженными границами. Незначительная вакуолизация цитоплазмы.	
Контаминация: - PPLO - BVD	– –	+ +	
Кариологические показатели			
Пределы изменчивости числа хромосом в клетках	43–58	49–104	
Модальное число хромосом: - количество, шт - процент, %	51 30	52 58	
Цитометрический анализ			
Размеры клеток, мкм	18,6±3,65	21,3±4,53	
Гранулярность, (МЕАМ)	387	444	
Апоптоз, %	3,9	6,8	
Чувствительность к вирусам			
Накопление вирусов (Lg ТЦД ₅₀ /мл)	ПГ-3	7,47 ± 0,06	7,10 ± 0,14
	ИРТ	7,60 ± 0,04	7,23 ± 0,10

В дальнейшем тестируемые сублинии клеток MDBK были проконтролированы на контаминацию посторонними агентами. Инфицированность ТК микоплазмами оценивали микробиологическим и цитохимическим методами и в полимеразной цепной реакции (ПЦР) по общепринятым методам [4,5].

Цитохимическим методом и в ПЦР микоплазменная инфекция была установлена в клетках сублинии MDBK-B. Контаминация указанной культуры вирусом диареи также была подтверждена.

Напротив, клетки сублинии MDBK-E не содержали вирусной и микоплазменной контаминации, характеризовались выраженным ростовым потенциалом, сохраняли исходную морфологию клеток в культуре и являлись наиболее перспективным субстратом для производства антигенов ПГ-3 и ИРТ.

При определении среднестатистических размеров клеток, что характеризует изменение среднестатистических размеров неокрашенных (интактных) клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B в процессе длительного культивирования. Увеличение или уменьшение размеров клеток, как правило, свидетельствует о нарушении процессов деления и появлении в образцах аномальной популяции клеток в культуре (рисунок 3).

В результате цитометрического анализа было показано, что интактные клетки сублиний MDBK-E и MDBK-B варьируют по величине и на уровне 30 и 43 пассажей после криоконсервирования, а также имеют среднестатистические размеры $18\pm 3,65$ и $21,3\pm 4,53$ мкм соответственно, что характерно для ПЛК клеток почек телят на стадии становления.

Показатель гранулярности (MEAM) характеризует состояние внутренней структуры клеток, соотношение ядра и цитоплазмы, а также свидетельствует о наличии аномальных и апоптотических клеток в ТК. Данные изменения клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B отражают параметр MEAM, показывающий среднестатистическое положение максимума пика рассеивания света клетками ТК под углом 90^0 , т.е. распределение клеток в зависимости от их гранулярности. Цитометрическому анализу подвергались неокрашенные клетки. Для дискриминации клеток, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, в программу анализа вводили логические ограничения.

Результаты распределения клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B по показателю гранулярности цитоплазмы представлены на рисунке 3. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что изолированные клетки сублиний MDBK также существенно различались по показателю гранулярности. В частности, более гранулярными были клетки сублинии MDBK-B (444). Для клеток сублинии MDBK-E показатель MEAM не превышал 387. Отмеченные факты свидетельствуют о нарушении процессов деления и появлении в популяции сублинии MDBK-B аномальных клеток.

Таким образом, полученные данные дают основание заключить, что

среднестатистические размеры и показатели гранулярности исследуемых сублиний клеток MDBK существенно различаются. Эти факты свидетельствуют о неадекватных условиях поддержания сублинии клеток MDBK-B в культуре.

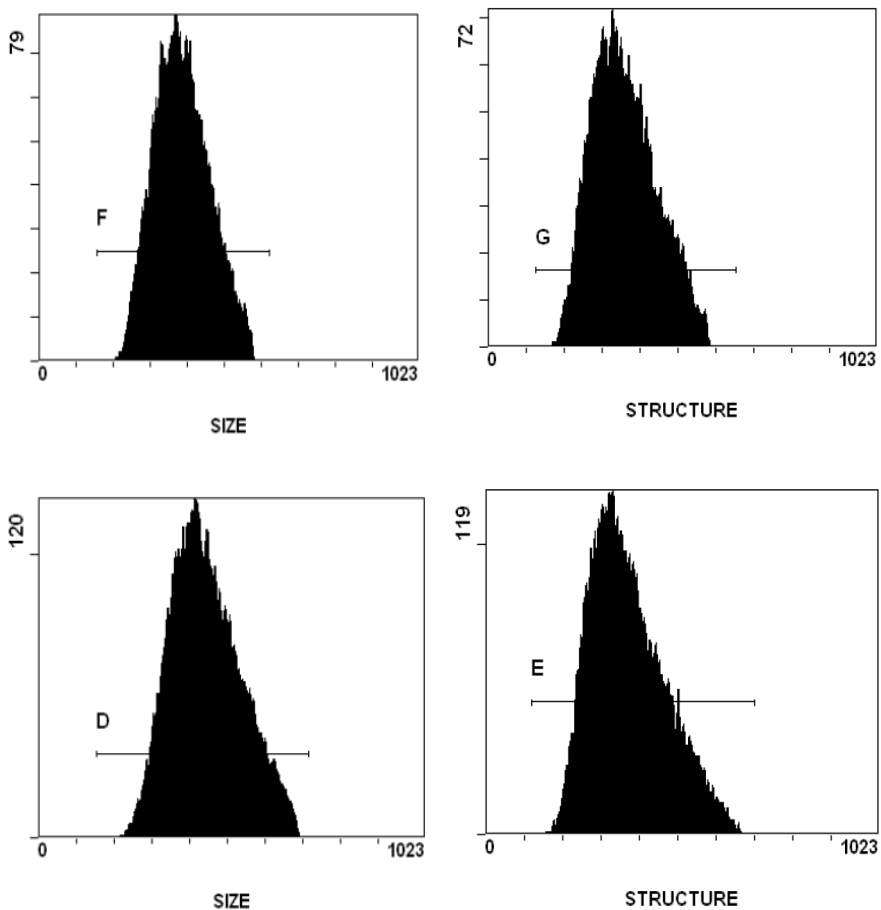


Рисунок 3 – Гистограммы распределения клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B по размерам (A и A1) и гранулярности (B и B1)

Чрезвычайно важной характеристикой клеток перевиваемых линий, определяющей перспективность их использования в практике является программированная (физиологическая) клеточная гибель - апоптоз. Данный показатель характеризуется сморщиванием клеток, межнуклеосомной фрагментацией ДНК с последующей дезинтеграцией мембран и образованием апоптотических телец. Напротив, при некрозе наблюдается набухание и разрыв клеточных мембран с выбросом содержимого во внеклеточное пространство. В наших экспериментах количество клеток, находящихся в состоянии спонтанного апоптоза, оценивали по распределению клеток окрашенных иодитом пропидия, в логарифмическом канале флюоресценции с использованием барьерных фильтров 488 ВК, 488 ВР и 625 ВР. Клетки, содержащие ДНК меньше $2n$ считали апоптотическими. Этот показатель отражает состояние клеточной популяции в период исследования. При оптимальных условиях культивирования и качественной ТК количество клеток, находящихся в состоянии спонтанного апоптоза, не превышает 14–19%. При ухудшении условий пассирования или в результате воздействия цитостатиков количество апоптотических клеток, как правило, существенно возрастает.

По показателю апоптоза исследуемые сублинии MDBK-E и MDBK-B не превышают нормативного показателя и находятся на уровне 3,9 и 6,8% соответственно. В тоже время высокие ростовые свойства, отсутствие контаминации и удовлетворительные показатели фаз клеточного цикла и апоптоза дают основание рекомендовать сублинию клеток MDBK-E как для производства антигенов, так и контроля активности вирусов ПГ-3 и ИРТ. Напротив, контаминация микоплазмами и вирусом BVD, более низкие показатели ростового потенциала и чувствительности к вирусам, также менее стандартные значения показателей клеточного цикла свидетельствуют о несоответствии сублинии MDBK-B требованиям отечественных и международных стандартов и непригодности данной КМ для практических целей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для оценки качества сублиний клеток MDBK апробирован и рекомендуется для практического применения достаточно эффективный экспресс-метод проточной цитометрии, который при 1000 раз большей выборке изолированных клеток позволяет в 20 раз быстрее получить статистически достоверные результаты о жизнеспособности, размерах, гранулярности, фазах клеточного цикла и апоптозе. С учетом полученных данных в качестве тканевого субстрата для производственных целей подобрана высокочувствительная сублиния клеток MDBK-E, характеризующаяся оптимальными цитометрическими показателями и высоким ростовым потенциалом, а также чувствительностью к модельным вирусам.

ЛИТЕРАТУРА

1 Глаголева, И.С. Репродукция производственных штаммов вирусов на культуре клеток новорожденных крольчат / Автореф. Дисс... канд. биол.н. 06.02.02 и 03.01.06, ФГБУ «ФЦТРБ–ВНИВИ», Казань : 2013. – 19 с.

2 Ковалев, Н.А., Вирусы и прионы в патологии животных и человека. / Красочко П.А. и др. Минск, Беларуская навука, 2012. – 426 с.

3 Методические рекомендации по выделению, культивированию и идентификации микоплазм, ахлеплазм и уреоплазм. – М., 1982. – 25с.

4 Методические рекомендации по способу выявления микоплазм в культурах перевиваемых клеток – М., – 1983.

5 Методические указания по диагностике возбудителей микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции – М., – 1997.