МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

АДАПТАЦИЯ КЛЕТОК MDCK К РОСТУ В МАЛО- И БЕССЫВОРОТОЧНОЙ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Р.Я. Подчерняева.[1], Г.А. Данлыбаева.[1], Н.А. Мазуркова[2], О.В. Бакланова[1], В.В. Честков[3], В.Ю.Табаков

[1] НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва; [2]ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, пос. Кольцово, Новосибирск обл.; [3]ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

После 5 пассажей в малосывороточной рисовой среде были получены адаптированные к росту в этой среде клетки линии МДСК. У этих клеток наблюдалась более низкая пролиферативная активность и изменение морфологии по сравнению с контролем. При этом сохранялась жизнеспособность клеток и активность репродукции вируса гриппа А (H1N1 и H3N2). Для адаптации клеток МДСК к полностью бессывороточной среде «Гибрис-2» потребовалось 17 серийных пассажей. У адаптированных клеток также наблюдалась пониженная пролиферативная активность и изменение морфологии. Репродукция вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2) была ниже на 0,5 $lgТЦД_{50}$ по сравнению с контролем, но вирус гриппа В активно размножался в адаптированных и контрольных клетках. Следовательно, как рисовая среда, так и среда «Гибрис-2» пригодны для культивирования клеток линии МДСК и могут применяться для репродукции вирусов гриппа.

Ключевые слова: клетки, адаптация, рисовая среда, бессывороточная среда, репродукция вирусов гриппа.

Известно, что применяемые для культивирования клеток стандартные питательные среды требуют обязательного добавления сыворотки крупного рогатого скота (КРС) или эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), что приводит к риску контаминации продуктами

животного происхождения. В связи с этим в последние годы особое внимание уделяется малосывороточным (1,3,4) и бессывороточным питательным средам (2,5).

Задачей данной работы являлось применение таких сред для культивирования клеток линии MDCK (почка собаки). Выбор этих клеток был обусловлен их чувствительностью к репродукции вирусов гриппа.

В 1-ой серии экспериментов нами применялась малосывороточная питательная среда на основе гидролизатов рисовой муки, разработанная в ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». Оптимизированный состав этой среды представляет собой ферментативные гидролизаты рисовой муки, растворенные в определенных концентрациях в сбалансированном растворе Эрла, в которую добавлены витамины, микроэлементы и индивидуальные аминокислоты.

Клетки MDCK выращивали в питательной среде с добавлением 3,4 и 5 % ЭТС фирмы ООО «ПанЭко». В качестве контроля применяли питательную среду Игла также с добавлением 3,4 и 5% ЭТС и 10 mML –глутамина. Посевная концентрация составляла $1x10^5$ кл/мл, клетки инкубировали в культуральных матрасах объемом 50 $см^3$ в течение 3-4 суток при 37 ^{0} С. В процессе работы учитывали следующие параметры: сроки образования монослоя, морфологию культуры, пролиферативную активность (ИП-индекс пролиферации) и жизнеспособность (в %).

Исследование показало, что клетки MDCK, пассируемые на стандартной среде Игла (контроль) формировали монослой на 2-3 сутки, значение ИП были зависимы от процентного содержания ЭТС в среде культивирования. Так, при добавлении 3 и 4% ЭТС ИП составлял от 4,0 до 7,3 -9,0 к 5 пассажу, а при применении 5% ЭТС значение ИП достигали 7,0-9,6 в течение 5 последовательных пассажей. Культура представлена эпителиоподобными клетками с четкими границами и крупными ядрами разнообразной формы, ядрышки крупные, от одного до нескольких в ядре. Цитоплазма ячеистая, патологических митозов не обнаружено.

При культивировании клеток MDCK на рисовой среде меняется морфология клеток – они приобретают удлиненную форму (веретеновидную), образуют густой монослой с наложением слоев клеток. Наблюдается сильная вакуолизация цитоплазмы. При этом снижается и ростстимулирующая активность клеток, значения ИП ниже по сравнению с контролем на 1,0-4,0 единицы, что однако не влияет на жизнеспособность клеток в течение 5 пассажей (живых клеток 84-96%).

Представляло интерес изучить чувствительность этой клеточной линии к репродукции вирусов гриппа H3N2 (штамм А/Висконсин/67/05) и H1N1 (штамм А/Новая Каледония/20/99). Показано, что репродукция штамма А/Висконсин/67/05 в рисовой среде была ниже на 1,0 lg ТЦД$_{50}$ по сравнению с контролем, а штамм А/Новая Каледония/20/99 репродуцировался в одинаковом титре в рисовой и контрольной средах.

Следовательно, для адаптации клеток MDCK к рисовой среде достаточно добавления 3% ЭТС на протяжении 5 последовательных пассажей, и эта среда может быть использована для репродукции вирусов гриппа H1N1 и H3N2.

Во 2-ой серии экспериментов для культивирования клеток MDCK применяли полностью бессывороточную среду «Гибрис-2» производства ООО «ПанЭко». Условия эксперимента были те же, что и с применением малосывороточной рисовой среды. Для получения адаптированной линии клеток к среде «Гибрис-2» было проведено 4 пассажа с 3% ЭТС, 3 пассажа с 2% ЭТС, 5 пассажей с 1% ЭТС и 6 пассажей без сыворотки (таблица).

Таблица. Адаптация клеток MDCK к росту в среде «Гибрис-2»

Пассаж	ЭТС (%)	«Гибрис-2»		ЭТС (%)	Игла	
		ИП	Ж (%)		ИП	Ж (%)
1	3	7,0	92	5	4,8	96
2	3	5,2	98	5	4,5	96
3	3	6,0	97	5	7,0	98
4	3	5,6	(98)			
1	2	6,4	98	5	7,5	98
2	2	6,0	96	5	7,0	89
3	2	6,5	98	5	6,0	99
1	1	7,0	96	5	6,0	98
2	1	8,0	87	5	6,0	96
3	1	7,0	97	5	6,0	97
4	1	6,5	96	5	6,0	98
5	1	6,0	96	5	6,5	97
1	0	3,0	97	5	6,0	97
2	0	2,5	97	5	6,0	98
3	0	2,8	96	5	6,0	97
4	0	2,2	85	5	6,0	97
5	0	2,0	85	5	6,0	97
6	0	2,0	85	5	6,0	97

Обозначения в табл.: ИП- индекс пролиферации, Ж – жизнеспособность клеток.

Из таблицы видно, что при культивировании клеток MDCK со средой «Гибрис-2» при добавлении 1% ЭТС ИП в отдельных пассажах был даже выше (до lg7,0-8,0 ТЦД$_{50}$) по сравнению с ИП в среде Игла (lg 6,0-7,0 ТЦД$_{50}$). Жизнеспособность клеток была идентичной контролю. При культивировании клеток в среде «Гибрис-2» наблюдалось снижение ИП к 4 пассажу до 2,2, а к 5 и 6 пассажам до 2,0 при сохранении жизнеспособности клеток до 85%. Следует отметить, что клетки в этой среде росли медленнее (4-5 суток) по сравнению с контролем (2-3 суток). Морфология клеток отличалась от контрольных меньшим размером, разнообразной величиной и формой ядер. Адаптированные клетки были заморожены в жидком азоте (-196 ^{0}С) и через 2 недели разморожены. При этом 95% клеток сохранили жизнеспособность и свои культуральные свойства в среде «Гибрис-2».

Как и в 1-ой серии экспериментов, нами проведено изучение репродукции вирусов гриппа А и В в клетках MDCK, адаптированных к этой среде. Показано, что лабораторный штамм А/Аичи/1/68 (H3N2) в одинаковом титре размножается как в контрольных, так и адаптированных клетках (lg 8,0 ТЦД$_{50}$). Другой штамм А/Брисбен/10/07 (H3N2) в адаптированных клетках репродуцируется слабее (lg 5,0 ТЦД$_{50}$) по сравнению с контролем (lg 6,0 ТЦД$_{50}$).

Штамм А/Соломоновы острова/3/06 вируса гриппа H1N1 тоже несколько слабее на 0,5 lg ТЦД50 репродуцируется в адаптированных клетках. Вирус гриппа В (штамм А/Огайо/01/05) размножается до 5,0 lg ТЦД$_{50}$ в адаптированных и контрольных клетках.

Следовательно, бессывороточная среда «Гибрис-2» пригодна для культивирования монослойных клеток MDCK и может применяться для репродукции вирусов гриппа А и В.

Список литературы

1. **Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Матюшина Р.О., Трошкова Г.П., Подчерняева Р.Я.** Питательная среда на основе гидролизата рисовой муки для культивирования клеток и определение чувствительности к вирусам гриппа. Клеточная технология, биология и медицина, 2009, 2: 113-116.
2. **Табаков В.Ю., Щепкина Ю.В., Честков В.В.** Суспензионные культуры клеток в бессывороточной среде «Гибрис-2». Вакцинология, 2008: 115-116.
3. **Трошкова Г.П., Мартынец Л.Д., Кирова Е.В. Сумкина Т.П., Юдин А.В.** Совершенствование технологии приготовления питательных сред на основе ферментативных гидролизатов рисовой и соевой муки. Биотехнология, 2006, 4: 74-78.
4. **Онищенко Г.Г., Мазуркова Н.А., Трошкова Г.П., Радаева И.Ф., Мартынец Л.Д., Сумкина Т.П., Ким И.И., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г.** Оптимизация технологии производства живой культуральной гриппозной вакцины с использованием питательной

среды на основе гидролизатов белков растительного происхождения, Биотехнология, 2007, 3: 31-37.

5. **Genzel Y., Olmer R., Shafer B., Reiche U.** Ware microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and Serum-free media. Vaccine, 2006,.24: 6074-6087.