

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук
Стрельченя И.И., кандидат ветеринарных наук
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук
Ткалич Е.С., младший научный сотрудник
Барсукова М.В., лаборант

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесесского», г. Минск

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПЕРЕВИВАЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ 3 КГ КАК СУБСТРАТА В ПРОИЗВОДСТВЕ БИОПРЕПАРАТОВ

Резюме

В статье представлены результаты оценки морфологии клеточной линии 3 КГ, а также результаты исследований клеточной линии 3 КГ на наличие бактериальных и вирусных агентов: культуральную жидкость клеточной линии 3 КГ исследовали в реакции гемагглютинации, а монослой – в реакции гемадсорбции.

Summary

The article presents the results of the assessment of the morphology of the 3 KG cell line, as well as the results of the studies of the 3 KG cell line for the presence of bacterial and viral agents: the culture fluid of the 3 KG cell line was investigated in the hemagglutination reaction, and the monolayer in the hemadsorption reaction.

Поступила в редакцию 01.10.2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие современных методов культивирования клеток имело решающее значение для экспериментальной и диагностической вирусологии. Ни одна современная биопромышленность не может обойтись без группы культивирования клеток. Особое место культура клеток занимает в производстве специфических, лечебно-профилактических и диагностических вирусных препаратов. В настоящее время в ряде стран широко используют постоянные линии клеток для изготовления ветеринарных биопрепаратов [1].

Широкое распространение культур клеток обусловлено прогрессом техники культивирования и появлением все большего числа клеточных линий.

В настоящее время все ведущие биологические научные учреждения усиленно развивают исследования, проводимые на клеточных культурах человека, животных, растений и насекомых.

Важную роль тканевые культуры играют в биотехнологии при производстве вакцин [7].

Использование постоянных линий клеток в качестве субстрата в производстве вирусных вакцин имеет ряд преимуществ:

1. Прижизненное наблюдение за клетками, их морфологическими и биохимическими особенностями различными методами, в том числе с использованием световой микроскопии.

2. Возможность оценки состояния клетки «прижизненно», а не «post factum», как в случае с опытами на животных.

3. Возможность изменения условий культивирования, что дает широкие возможности в оценке факторов, влияющих на клеточный метаболизм.

4. Оценка и получение результатов, при использовании небольшого количества клеточного материала, что снимает проблему использования большого количества животных.

5. Использование клеточной культуры снимает множество этических проблем, связанных как с использованием большого количества клинического материала, так и при тестировании потенциально опасных и токсических веществ.

6. Клеточная культура доступна для различных биохимических манипуляций, в том числе с ядами, гормонами, токсинами, радиоактивными соединениями и т.д.

7. При использовании клеточной культуры оценивается прямое воздействие исследуемого вещества без опасения, что оно будет метаболизировано печенью или почками.

8. Становится возможным рассчитать точную концентрацию тестируемого вещества, вызываемого тот или иной эффект [3].

Одним из важных преимуществ является то, что клеточные культуры не требуют сложных условий культивирования, их можно выращивать в промышленных культиваторах и ферментерах, а маточные раскладки, свободные от контаминации эндогенными и экзогенными вирусами, длительно хранить при низкой температуре. Многие ученые считают, что приготовление вакцин с использованием перевиваемых клеточных линий по сравнению с первичными культурами клеток представляет меньший риск вирусной контаминации [4, 8].

Существенным недостатком клеточных культур, осложняющим их применение, особенно в производстве живых вакцин, является бактериальная, микоплазменная, грибковая и вирусная контаминация.

Проблема контаминации клеточных культур возникла с момента применения культур клеток для производства вирусных вакцин. Источником контаминации бактериями, микоплазмами и вирусами в вакцинах могут быть материалы и условия культивирования (сыворотка, трипсин, воздух, загрязнения в процессе производства). Культура клеток может быть контаминирована различными посторонними вирусами, патогенность которых для животных не всегда известна [5].

В связи с этим необходимо правильно

организовать работу в лабораториях с целью предотвращения контаминаций. Многие часто пренебрегают самыми основными законами и необходимыми правилами ведения клеточных линий и расплачиваются за это неудачами в своей работе.

Перевиваемые культуры клеток проверяют на бактериальную и вирусную контаминацию, используя различные микроскопические, вирусологические, серологические исследования.

Бактериальная контаминация легко обнаруживается по помутнению культуральной среды под микроскопом или при посеве на жидкие и твердые бактериологические питательные среды.

Спонтанные заражения клеточных культур микоплазмами заметить не так просто (особенно на ранних стадиях инфекции), если не применять специальных методов контроля.

Методы контроля должны гарантировать отсутствие в культуре клеток экзогенных и эндогенных вирусов [2].

Целью работы явилось исследование морфологии производственной перевиваемой клеточной линии 3 КГ и контроль наличия посторонних агентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в отделе культур клеток и питательных сред и в отделе болезней птиц, пчел и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского».

Контроль клеточных культур 3 КГ – субстрата производства и контроля ветеринарных иммунобиологических препаратов – исследовали на микробиологическую стерильность, наличие микоплазм и вирусов, также проводили оценку морфологии клеток.

Исследования проводили в несколько этапов.

На первом этапе суспензию клеток исследовали на микробиологическую стерильность и наличие микоплазм.

Исследование контаминации суспензии клеток 3 КГ бактериями и грибами

проводили путем посева по 1,0 см³ в пробирки агаром Сабуро и тиогликолевой средой. Посевы делали в две пробирки с каждой питательной средой и выдерживали на агаре Сабуро в термостате при температуре +20 °С, а на тиогликолевой среде – при температуре +35 °С в течение 14 суток.

Исследование контаминации суспензии клеток 3 КГ микоплазмой проводили путем посева по 10,0 см³ на 100,0 см³ жидкой среды PPLO. При этом проводили посев по 0,2 см³ на чашку Петри с твердой средой PPLO. Жидкую среду инкубируют в течение 21 дня, твердую среду – 14 дней. На 2–4 день после инокуляции проводили пересевы по 0,2 см³ с жидкой среды PPLO на чашку Петри с твердой средой PPLO. Данную процедуру повторяли на 6–8 день, на 13–15 день и на 19–21 день испытания.

Суспензия клеток считается стерильной, если в течение указанного срока отсутствует рост бактерий, грибов и микоплазм.

На втором этапе проверяли состояние монослоя интактных клеток исследуемой линии в течение 14 суток.

Контролю подвергали клеточную линию 3 КГ. Культуру клеток выращивали в пластиковых культуральных флаконах объемом 75 см² при температуре +37 °С. Для выращивания использовали ростовую питательную среду ФМГ-С : ДМЕМ (3:1) с добавлением 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота. Ежедневно вели наблюдение за качеством сформировавшегося монослоя визуально и с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив 10х).

На третьем этапе культуральную жидкость, полученную от культивируемой в течение 14 суток клеточной линии 3 КГ, исследовали в капельной реакции гемагглютинации с эритроцитами петуха, а монослой – в реакции гемадсорбции.

Для этого из культурального флакона удаляли питательную культуральную среду, монослой клеток отмывали 0,85 % натрия хлорида при температуре 20–25 °С. В матрас с клеткой вносили 0,25 % взвесь эритроцитов, в объеме достаточном, чтобы

покрыть весь клеточный монослой. Культуральные флаконы инкубировали 30 минут при температуре +4 °С, а затем 30 минут при температуре +20–25 °С. Из культурального флакона удаляли взвесь эритроцитов и трижды отмывали 0,85 % раствором натрия хлорида. Клеточный монослой исследовали под микроскопом Nikon Eclipse TS100.

На четвертом этапе пробы культуральной жидкости исследовали в трех видах клеточных культур (Vero, ВНК-21, МДБК).

Для этого из всех испытуемых культуральных флаконов сливали равные объемы проб и объединяли. В три различные тест-культуры (Vero, ВНК-21, МДБК) вносили одну часть контролируемой среды (смесь проб) и четыре части свежей питательной среды. Инкубировали при температуре +37 °С. Наблюдение за качеством сформировавшегося монослоя вели визуально и с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив 10х) в течение 14 суток. На 6 сутки после инокуляции в тест-культурах проводили смену среды. В конце срока культивирования монослой изучали в реакции гемадсорбции, а культуральную жидкость – в реакции гемагглютинации с эритроцитами морской свинки.

На пятом этапе проводили контроль жизнеспособных клеток 3 КГ на SPF-куриных эмбрионах.

Для этого культуру клеток 3 КГ в концентрации 1х10⁶ вводили 10 SPF-эмбрионам 11-суточного возраста в аллантоисную полость. За эмбрионами вели наблюдение в течение 5 суток. По истечении данного срока наблюдения аллантоисную жидкость исследовали в реакции гемагглютинации с эритроцитами петуха.

На шестом этапе проводили оценку морфологии клеток 3 КГ. Для этого выращивали культуру клеток на предметных стеклах, используя ростовую питательную среду ФМГ-С: ДМЕМ (3:1) в течение 72 часов при температуре +37 °С. Затем фиксировали препарат этанолом в течение 10 минут при температуре +20–25 °С, после

чего клетки окрашивали неразведенным красителем Гимза, промывали монослой в деионизированной воде и исследовали клетки под микроскопом, пока монослой оставался влажным.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Суспензия клеток 3 КГ стерильна, т.к. в течение всего срока исследования на питательных средах (МПА, агар Сабуро, МПБ, тиогликоливая среда, PPLO) отсутствовал рост бактерий, грибов и микоплазм.

Результаты ежедневного наблюдения за качеством сформировавшегося монослоя визуально и с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив 10х) показали, что изменений состояния монослоя (дегенеративных изменений, симпластов и т.д.) не наблюдалось. При просмотре культуральных флаконов под микроскопом на 14 сутки наблюдали 100 %-ный клеточный монослой. При этом клеточная линия 3 КГ имела типичную для данной линии морфологию (фибробластоподобный тип роста) и сохраняла стабильность биологических свойств в течение срока культивирования (рисунок 1).



Рисунок 1. – Перевиваемая культура клеток 3 КГ. Клеточный монослой через 14 суток культивирования. Объектив 10х

При постановке капельной реакции гемагглютинации с эритроцитами петуха в исследуемой культуральной жидкости агглютинация отсутствовала.

Учет реакции гемадсорбции проводили под микроскопом после непродолжительного покачивания культурального флакона для отделения неадсорбированных

эритроцитов от поверхности клеток. Результаты исследований показали, что адсорбция эритроцитов на культуре клеток не наступила и они свободно плавали в поле зрения микроскопа (рисунок 2).

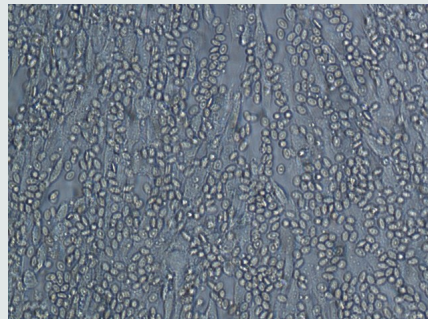


Рисунок 2. – Отрицательная реакция гемадсорбции. Свободно плавающие эритроциты в поле зрения микроскопа. Объектив 20х

Результаты исследования культуральной жидкости и монослоя в трех видах клеточных тест-культурах (Vero, ВНК-21, МДБК) показали отсутствие агглютинации и адсорбции эритроцитов.

Контроль клеточной линии 3 КГ на SPF-куриных эмбрионах показал отсутствие агглютинации в аллантаической жидкости.

Оценка морфологии клеток показала, что клетки имели фибробластоподобный тип роста, цитоплазма и ядро ориентированы по длинной оси клетки. Цитоплазма с характерной зернистостью. Ядро содержит 1–4 ядрышка. Клетки прозрачны, расположены параллельными группами, ориентированными в различных направлениях.

Результаты окраски по Гимза представлены на рисунке 3.

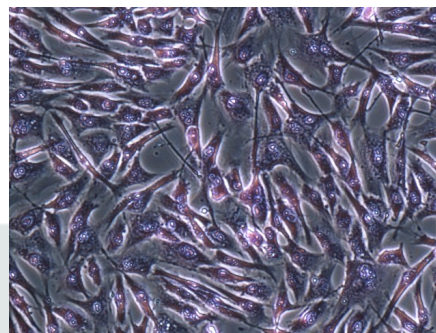


Рисунок 3. – Окраска по Гимза клеток 3 КГ. Объектив 20х

Как видно из рисунка 3, при окрашивании клеток по Гимза ядро окрасилось в розовый цвет, ядрышки – в темно синий, а цитоплазма – в бледный серо-голубой цвет.

ВЫВОДЫ

1. Клеточная культура 3 КГ – субстрат производства и контроля ветеринарных иммунобиологических препаратов – стерильна (отсутствует рост бактерий, грибов и микоплазм).

2. Клеточная линия 3 КГ имела типичную для данной линии морфологию (фибробластоподобный тип роста) и сохраняла стабильность биологических свойств в течение срока культивирования.

3. В культуральной жидкости отсутствует агглютинация эритроцитов, а в монослое – адсорбция эритроцитов.

4. В трех различных тест-культурах (Vero, ВНК-21, МДБК) отсутствует агглютинация и адсорбция эритроцитов.

5. В аллантоисной жидкости отсутствует агглютинация при контроле клеточной линии 3 КГ на SPF-куриных эмбрионах.

6. Клетки имеют фибробластоподобный тип роста. При окраске по Гимза ядро окрасилось в розовый цвет, ядрышки – в темно синий, а цитоплазма – в бледный серо-голубой цвет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешн; пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2014. – 691 с.
2. Вечканов, Е.М. Клеточная инженерия: учебное пособие / Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина. – Ростов-на-Дону, 2012. – 136 с.
3. Фадеев, Ф.А. Возможности использования технологии автоматизированного культивирования при получении клеточных линий для терапевтического применения / Ф.А. Фадеев, Д.В. Луговец, М.В. Улитко // Клеточные технологии – практическому здравоохранению: сборник материалов IV научно-практической конференции. – Екатеринбург: Вестник уральской медицинской академической науки, 2015. – С. 57–62.
4. Хапчаев, Ю.Х. Разработка методов получения и культивирования первичных и перевиваемых культур клеток животных для производства вирусных вакцин: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06. / Ю.Х. Хапчаев. – М., 2003. – 47 с.
5. Опыт создания банка авторских линий перевиваемых клеток и их применение в вирусологической практике / Л.Л. Миронова [и др.]. // Биотехнология. – 2000. – № 6. – С. 41–46.
6. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Л.П. Дьяконов, В.И. Ситыков; под ред. проф. Л.П. Дьяконова, проф. В.И. Ситыкова. – М.: Компания Спутник+, 2000. – 400 с.
7. Колокольцева, Т.Д. Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль / Т.Д. Колокольцова, И.Н. Сабурова, А.А. Кубатиев // Патогенез. – 2015. – Т. 13. – Ч. 2. – С. 50–65.

ЭНТЕРОПОЛИСОРБ

диарея

• показание к применению –
диарея и пищевые интоксикации

**Свежее решение
для защиты ваших
животных**

• обладает сорбционным и
детоксикационным действием