

# Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль

Колокольцова Т.Д.<sup>1,2</sup>, Сабурова И.Н.<sup>1,2</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> — ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России Москва, Россия

Прогресс современной биологии, иммунологии и медицины в значительной степени обусловлен созданием условий культивирования *in vitro* клеток различного происхождения, открытием стволовых и прогениторных клеток, а также высокой перспективой применения их в научных исследованиях, производстве препаратов для иммунопрофилактики, диагностики и лечения. Наличие нескольких линий клеток в лаборатории, особенно занимающихся получением собственных культур, создает предпосылки не только для загрязнения клеток посторонними микроорганизмами, но и контаминации клеток клетками других линий. Эти данные подчеркивают чрезвычайную важность создания специализированных коллекций культур клеток и характеристики поступающих и вновь получаемых культур клеток, используемых в научных или прикладных исследованиях. Стабильность производства препаратов для иммунопрофилактики, диагностики или лечения в значительной мере зависит от стабильности свойств и безопасности используемых клеток. Основой получения безопасного продукта должна быть стандартизованная и аттестованная культура клеток. Создание системы контроля клеток, основанной на получении паспортизованных коллекций и аттестованных банков клеток, пригодных для научных исследований, разработки новых технологий, производства препаратов и лечения, позволит обеспечить гарантии качества, стабильности и безопасности клеток. В обзоре рассматриваются современные подходы и требования к контролю культур клеток, важности создания и контроля посевных и рабочих банков клеток, используемых в научных исследованиях и для производства, диагностики и лечения.

**Ключевые слова:** культура клеток, культивирование, контроль, безопасность, контаминация, идентификация, посевной и рабочий банк, аттестация, коллекция культур клеток

## Список сокращений

**АТСС** — Американская коллекция типовых культур клеток

**ВОЗ** — Всемирная Организация Здравоохранения

**ВСКК (РККК)** — Всесоюзная коллекция клеток (Российская коллекция культур клеток)

**Г-6-ФДГ** — глюкозо-6 фосфатдегидрогеназа

**ДНК** — дезоксирибонуклеаза

**ЕСАСС** — Европейская коллекция культур клеток животных

**ИФА** — иммуноферментный анализ

**ЛДГ** — лактатдегидрогеназа

**МДГ** — малатдегидрогеназа

**МИБП** — медицинский иммунобиологический препарат

**ПЦР** — полимеразно-цепная реакция

**РНК** — рибонуклеаза

**рчЭПО** — рекомбинантный эритропоэтин человека

**СНО** — линия клеток яичников китайского хомячка

**СПИД** — синдром приобретенного иммунодефицита

**ЦМВ** — цитомегаловирус

**BSL2** — ламинарный шкаф второго уровня биобезопасности

**FDA** — орган контроля продуктов и лекарств в США

**GLP** — надлежащая практика лабораторных исследований

**GMP** — надлежащая практика производства

**HeLa** — линия клеток человека, выделенная из опухоли шейки матки

**MDCK** — линия клеток почки собаки

**VERO** — линия клеток почки зеленой мартышки

**МК** — модальный класс хромосом

**PPLO** — специальная жидкая или полужидкая агаровая среда для выращивания микоплазм

## Введение

Прогресс современной биологии, иммунологии и медицины в значительной степени обусловлен созданием условий культивирования *in vitro* клеток различного происхождения, открытием стволовых и прогениторных клеток, а также высокой перспективой применения их в регенеративной медицине.

Метод культур клеток является уникальным и вместе с тем широко применяется в настоящее время, как в практических, так и в научных исследованиях. Это обусловлено, в первую очередь, созданием адекватных питательных сред, ферментов для разделения тканей, антибиотиков, выделению факторов роста, созданию целой индустрии производства культуральной посуды и установок для выращивания клеток. Все это позволило получать не только перспективные линии клеток человека и животных, широко использовать их в научных исследованиях, но и создавать на их основе новые современные технологии производства.

Число линий клеток постоянно растет, часто клетки внешне трудноотличимы. Они имеют сходную морфологию и ростовые свойства. Наличие нескольких линий клеток в лаборатории, особенно занимающихся получением собственных культур, создает предпосылки не только для загрязнения клеток посторонними микроорганизмами, но и контаминации клеток клетками других линий. Использование культур клеток с отсутствием идентификационных характеристик ставит под сомнение адекватность получаемых результатов. Эти данные подчеркивают чрезвычайную важность создания специализированных коллекций культур клеток и характеристики поступающих и вновь получаемых культур клеток, используемых в научных или прикладных исследованиях.

Современные питательные среды позволяют не только культивировать многие уникальные типы клеток в системе *in vitro*, но и производить достаточно большие количества продукта в клетках при масштабном их культивировании. Благодаря способности вирусов размножаться и вызывать цитопатогенное действие в культивируемых соматических клетках, культуры клеток получили широкое распространение в проведении вирусологических исследований и производстве вакцинных или диагностических препаратов.

Чрезвычайно важной оказалась возможность использования клеток животных для получения генно-инженерных препаратов. Например, именно правильное гликозилирование и полноценная «сборка» полипептида эритропоэтина (ЭПО) сделали культуру клеток СНО-рЕ, выделенную из яичников китайского хомячка, высокоперспективной для производства генно-инженерного ЭПО с высокой биологической активностью *in vivo*.

Стабильность производства препаратов для иммунопрофилактики, диагностики или лечения в значительной мере зависит от стабильности свойств и безопасности используемых клеток. Для контроля клеток, как субстратов для применения в производстве или лечения, разработаны и узаконены как национальные, так и международные требования. Согласно этим требованиям, система создания посевных и рабочих банков клеток, аттестованных в соответствии с современными требованиями, а также создание условий производства в соответствии с правилами GLP и GMP является обязательным и обеспечивает, главным образом, стандартность и безопасность клеток, ис-

пользуемых в производстве медицинских иммунобиологических препаратов.

Уникальным и перспективным представляется совершенно новое направление применения клеток для регенеративной медицины. Замена больного органа на «здоровый» путем трансплантации, несомненно, имеет свои преимущества, однако ограниченность в наличии жизнеспособных органов и необходимость ожидания органа иногда приводят к необратимым последствиям. В таком случае трансплантация клеток может стать альтернативным методом спасения больных как с острой недостаточностью органов (печени, почек, поджелудочной железы и др.), так и при их нарушении (ожоговые и трофические раны) или функциональных недостатках органов и тканей (миодистрофия Дюшенна, болезнь Альцгеймера, паркинсонизм, инфаркт миокарда и др.).

Успешное применение трансплантации клеток показано как в моделях на животных, так и в медицинской практике. Несомненна эффективность метода при лечении болезней сердца, мышечных тканей или эндокринных органов. Подтверждена высокая эффективность метода при лечении ран различной этиологии. Широкое же применение клеток в клинике, к сожалению, ограничено из-за проблемы выбора источника получения клеток и проблемы получения аттестованного клеточного материала.

Техника культивирования клеток и тканей постоянно меняется, и многие методические приемы систематически модернизируются, одновременно с этим совершенствуются методы контроля клеточных культур. Открытие стволовых и прогениторных клеток, высокая подвижность в дифференцировке клеток, выращиваемых *in vitro*, требует особенно тщательного контроля контаминации и безопасности клеток.

Основой получения безопасного продукта должна быть стандартизованная и аттестованная культура клеток. Именно создание системы контроля клеток, основанной на получении паспортных коллекций и аттестованных банков клеток, пригодных для научных исследований, разработки новых технологий, производства препаратов и лечения, позволит обеспечить гарантии качества, стабильности и безопасности клеток.

### 1. Получение и культивирование клеток человека и животных

Основание метода культуры клеток относят к началу XX века, когда была показана возможность выживания и деления клетки животного в системе *in vitro* (Jolly, 1903). Реальное начало метода культивирования клеток и тканей животных связано с именем Ross Harrison (1907), который выделил и кратковременно культивировал ткани лягушки. Alexis Carrel (1912) использовал ткани и эмбриональный экстракт в качестве среды для поддержания органной культуры. Бурное развитие метода в 40–50-х годах связано с открытием ферментов и, в связи с этим, возможностью выделения суспензии отдельных клеток.

Первые попытки культивирования кусочков ткани в виде органных культур относятся к началу прошлого века, а культивирование отдельных клеток не удавалось. Основной причиной неудач было отсутствие адекватной питательной среды. Начало успешного развития метода культивирования отдельных клеток следует отнести к 1941 г., когда W.R. Earle вывел первую перевиваемую

линию мышечных клеток L, широко распространенную и до настоящего времени в клональном варианте L<sub>929</sub> (NCTC 929). Именно в это время были разработаны способы ферментативного диспергирования тканей и получения однослойных культур клеток, сконструированы первые адекватные и сравнительно доступные питательные среды.

**Введение антибиотиков принципиально расширило возможность борьбы с бактериальной контаминацией.** В результате исследователи смогли регулярно и с высокой эффективностью получать первичные, а затем перевиваемые клеточные культуры. Серьезным этапом развития метода стало получение из карциномы человека линии клеток HeLa, способных неопределенно долго расти *in vitro* и восприимчивых к большому числу различных вирусов человека.

Поворотным моментом, определившим бурное развитие и применение метода культур клеток, стало открытие J.F. Enders с сотрудниками, показавших способность вируса полиомиелита размножаться в культивируемых соматических клетках животного *in vitro*. Авторы обосновали возможность производства полиовакцины в первичных культурах клеток почек обезьян.

Теоретические изыскания в комплексе с практически разработками привели к революционным изменениям в диагностике вирусных инфекций, выделении и идентификации вирусов, обусловили открытие новых таксономических групп вирусов, таких, как аденовирусы, риновирусы, и вызвали стремительное расширение состава известных групп. За полиовакциной последовала разработка других культуральных вакцин, в частности, против кори, краснухи, бешенства.

Усовершенствование методов и технологий получения и культивирования первичных и диплоидных культур привело к увеличению исследований с применением клеток. И практически все известные линии диплоидных и перевиваемых клеток были получены, в первую очередь, для исследования вирусов или наработки вакцинных пре-

паратов. Позднее, с развитием методов генетической инженерии, культуры клеток стали использовать для получения высокопродуктивных штаммов-продуцентов биологически активных и лекарственных препаратов.

### 1.1. Выделение клеток из тканей и органов

В настоящее время культуру клеток, потенциально, можно получить практически из любого органа или ткани человека или животного. Но чаще всего используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов или молодых животных, эмбриональный или фетальный материал.

**Выделение первичной суспензии клеток** проводят в специальных ламинарных шкафах, обеспечивающих определенный уровень биобезопасности (BSL2) и соблюдение асептических условий работы. При этом важно исключить условия контаминации (загрязнения, инфицирования) как выделяемой культуры клеток, так и обеспечить условия безопасности для самого исследователя в случае, если ткани или клетки инфицированы посторонними микроорганизмами.

Ткань или орган забирают с соблюдением условий асептики, помещают в стерильный солевой раствор, это может быть 0,9% раствор NaCl, раствор Хэнкса, Эрла и др., и транспортируют в специализированную лабораторию.

На рис. 1 представлена схема выделения клеток из плаценты, которая включает стандартные этапы выделения клеток. Скальпелем или ножницами измельчают ткань или орган до кусочков размерами не более 1–3 мм, тщательно отмывают от клеток крови в нескольких сменах стерильных растворов, а затем помещают в растворы ферментов, позволяющих изолировать отдельные клетки. Для этого чаще всего используют (0,25–0,5)% раствор трипсина. Могут также быть использованы коллагеназа, протеаза и т.д.

Часто при механическом измельчении ткани повреждаются ядра клеток и «выпавшая» ДНК под воздействием

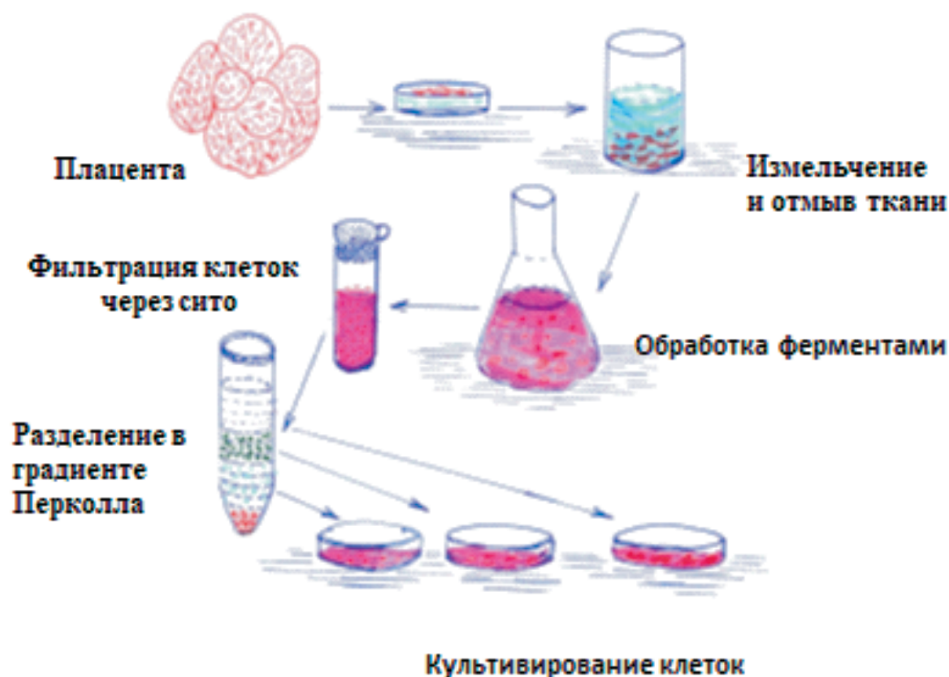


Рис. 1. Схема выделения первичной культуры цито- и синцитиотрофобластов из плаценты человека. Рисунок Колокольцовой Т.Д.

трипсина «распутывается» и увеличивает вязкость раствора с клетками, что не дает в последующем выделить отдельные клетки фильтрованием через специальное сито. Поэтому в ряде случаев в раствор добавляют ДНКазу, которая «режет» нити ДНК и, таким образом снижает вязкость раствора.

Для отделения, например, трофобластов от других типов клеток плаценты используют, кроме того, метод разделения клеток разных размеров в градиенте плотности Перколла (Percoll gradient) (рис. 1). Клетки, выделенные с помощью ферментов, профильтрованные через сито с определенным размером, центрифугируют, осадок клеток ресуспензируют в питательной среде, разливают в культуральные флаконы и помещают в термостат или CO<sub>2</sub> инкубатор для дальнейшего культивирования.

### 1.2. Типы культур клеток

Культуры клеток могут быть первичными, диплоидными или перевиваемыми.

**Первичные культуры клеток** получают путем диспергирования тканей разными методами: механически измельчая ткани с помощью ножниц, гомогенизатора и т.д.; выделяя клетки с помощью ферментов, главным образом, растворов трипсина, коллазы, протеазы и т.д.

Выделенные клетки выращивают в питательной среде *in vitro* в течение 1—3 пассажей и используют в производстве вакцин, для тестирования препаратов или типирования вирусов. Наиболее часто используют первичные фибробласты эмбрионов японских перепелов либо куриные эмбриональные фибробласты. В последние годы первичные культуры клеток рассматриваются как высокоперспективные для исследования дифференцировки клеток и регенеративной медицины.

При дальнейшем субкультивировании клетки могут формировать монослой, сохранять нормальный (диплоидный) набор хромосом и выдерживать пересевы до 50—60 пассажей. Такие культуры клеток считают **диплоидными** и их широко используют для производства вакцин, получения диагностических препаратов или заместительной терапии.

Некоторые культуры клеток при длительном культивировании приобретают способность к размножению вне организма неопределенно длительное время. Полагают, что механизм происхождения **перевиваемых культур клеток** — результат их генетической изменчивости. Клетки перевиваемых культур имеют одинаковую форму, сохраняют, как правило, гетероплоидный набор хромосом, стабильны в условиях роста *in vitro*, некоторые из них обладают онкогенной активностью. Последнее свойство ограничивает их использование при производстве вакцин. Перевиваемые культуры клеток часто называют **линиями клеток** из-за стабильности их характеристик и неограниченности жизни *in vitro*.

Перевиваемые линии клеток можно получить как из здоровых тканей животных, так и из опухолевых. Многие известные линии клеток человека или животных были получены из опухолевых тканей: Нер-2 (карцинома гортани человека); Нер-3 (лимфоидная карцинома человека), He-La (раковая опухоль шейки матки женщины Henrietta Lack); или нормальных тканей человека и животных: СНО (яичники китайского хомячка), Vero, CV, 4647 (почка зеленой марышки), ВНК (почка новорожденного хо-

мячка); L<sub>929</sub> (фибробласты нормальной подкожной ткани мыши), МДСК (почка щенка собаки) и другие.

Несколько труднее получать культуры клеток насекомых из-за их малых размеров, а также из-за проблемы получения микробиологически стерильного материала. «Опухоли», часто описываемые у насекомых, не являются источником быстро пролиферирующих клеток, как и у позвоночных. Из-за малых размеров насекомых чаще используют целых насекомых, гомогенаты целых эмбрионов или только что отродившиеся личинки первого возраста, полученные из предварительно поверхностно-стерилизованных яиц. Так были получены известные линии клеток комаров *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, перевиваемые культуры клеток *Drosophila melanogaster*, многие известные линии клеток чешуекрылых насекомых SF-21, SCLd-135, IPLBLd-65z и другие.

Культуры клеток насекомых используют для исследования и выращивания вирусов теплокровных животных, а также для производства рекомбинантных белков или препаратов, пригодных для борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства.

Таким образом, развитие современной науки позволяет получать первичные, диплоидные и перевиваемые культуры клеток человека и животных, высокоперспективные для проведения вирусологических и биотехнологических исследований.

Ограничение сроков жизни диплоидных культур, пригодных для производства вакцинных, диагностических препаратов или препаратов для клеточной терапии, а также отсутствие отечественных линий клеток насекомых, перспективных для производства рекомбинантных или энтомопатогенных препаратов, подчеркивают целесообразность проведения исследований по получению новых культур клеток человека и животных. Успех в культивировании и поддержании клеток *in vitro* в большой степени зависит от индустрии производства питательных сред.

### 1.3. Питательные среды для выращивания клеток

Питательная среда является одним из важнейших компонентов выращивания клеток *in vitro*. Многие из удач, связанных с высокой скоростью роста и продуктивностью культур клеток, обязаны питательной среде, которая является источником питательных веществ, минералов, микроэлементов и ростовых факторов. Если первые попытки культивирования клеток были связаны с использованием только компонентов крови или лимфы, то в настоящее время разработан целый ряд уникальных составов сред, в том числе и бессывороточных или сред с определенным химическим составом.

В последние годы созданы специализированные среды для выращивания клеток из разных тканей и органов, учитывающие определенные особенности метаболизма клеток или уровень их дифференцировки. К наиболее распространенным и универсальным средам можно отнести: среда 199, Игла MEM, Игла DMEM, RPMI1640 и другие. Для культивирования малодифференцированных клеток часто используют среды F12 или DMEM/F12.

Набор выпускаемых в настоящее время сред позволяет выбирать среды для культивирования клеток разного тканевого и видового происхождения, определяемого особенностями биологии этих клеток в культуре. Понятие оптимизации среды впервые возникло с развитием масштабного культивирования клеток. В настоящее время раз-



работана целая индустрия производства и совершенствования питательных сред для увеличения продуктивности культур клеток.

**Сыворотка крови животных** в большинстве случаев является одним из важнейших компонентов питательных сред. В ней содержатся пептидные ростовые факторы, стимулирующие клеточную пролиферацию, и другие важные для жизнедеятельности клетки *in vitro* компоненты. Однако сыворотка, к сожалению, остается неопределенным по составу фактором при производстве вакцинных и лекарственных препаратов. Кроме того, по-прежнему, высока вероятность переноса инфекций. Поэтому в последние годы особенно активизировались исследования по созданию бессывороточных сред, пригодных для культивирования технологически перспективных линий клеток. Что касается качества современных бессывороточных сред, то они не универсальны и часто ограничивают качественные и ростовые свойства культивируемых клеток.

Таким образом, современные питательные среды позволяют не только культивировать многие уникальные типы клеток, но и производить достаточно большие количества продукта в клетках при масштабном их культивировании. Несмотря на множество исследований, бессывороточные среды не универсальны.

Сыворотка крови животных, по-прежнему, остается одним из важнейших компонентов питательной среды. Поскольку сыворотка крови может нести потенциальную опасность из-за присутствия контаминантов, следует осо-



Рис. 2. Масштабное культивирование субстратзависимых клеток в монослое

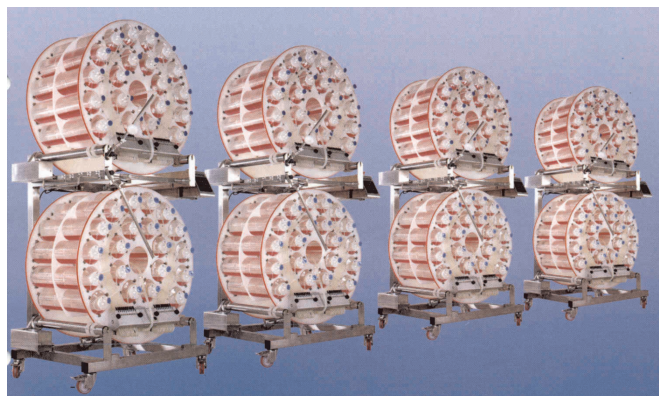


Рис. 3. Масштабное культивирование клеток в роллерных установках

бенно внимательно относиться к вопросам контроля не только сыворотки, но и безопасности клеток и выращиваемого на них продукта.

#### 1.4. Современные способы культивирования клеток

Культуры клеток в большей части субстратзависимы и растут в монослое на стекле или пластике. Некоторые типы клеток растут в суспензии в стационарных условиях либо при перемешивании. Для этого используют шейкерные установки либо биореакторы с внутренним перемешиванием питательной среды с клетками.

Основы промышленного культивирования клеток млекопитающих были заложены в начале 60 годов, а уже к концу 70-х различные компании и научно-исследовательские центры смогли наладить крупномасштабное получение одного из важнейших препаратов медицинского назначения — альфа интерферона. В настоящее время достаточно отработаны технологии производства моноклональных антител, генно-инженерных препаратов и вакцин.

**Основной проблемой** при выращивании клеток животных является повышение эффективности использования компонентов питательной среды и увеличение продуктивности клеток. Поскольку большая часть линий клеток животных субстрат зависима, то задача сводится к увеличению доступной для роста клеток поверхности в расчете на единицу объема питательной среды.

Традиционно большинство типов клеток выращивают в монослое. Для решения проблем **выращивания клеток в монослое** разработаны многоуровневые культуральные флаконы — «фабрики клеток» (CellStack® Culture Chambers, Corning LifeSciences (Acton, MA, США), с площадью ростовой поверхности дна флакона 636 см<sup>2</sup> до более 40 отделений с общей площадью для выращивания клеток 25 440 см<sup>2</sup>. Такие флаконы могут использоваться для наработки большого числа первичных, диплоидных культур клеток, в том числе используемых для наработки генно-инженерных или вакцинных препаратов (рис. 2).

Субстратзависимые клетки можно также культивировать на стенках круглых флаконов (роллерных бутылях) в небольшом количестве питательной среды постоянно поворачивая флаконы. Выращивание клеток в роллерных бутылях позволяет в 8—10 раз увеличить поверхность по отношению к одинаковому со стационаром объему среды.

**Роллерное культивирование** привлекает простотой, надежностью, экономичностью и возможностью в короткое время развернуть промышленное производство. Постоянное чередование жидкой и воздушной фаз, омывающих монослой, создает благоприятные физиологические условия для роста клеток и способствует значительному повышению продукции препаратов или репродукции вирусов в таких условиях. Показано, что урожай вируса гриппа и парагриппа в роллерных системах культивирования повышается в 10—15 раз (рис. 3).

В Италии для наработки вакцин в заводских условиях используют 28 тыс. роллерных флаконов, контролируя при этом только температуру и скорость вращения. Замена стеклянных флаконов на «гофрированные» из пластика позволила получить 20-кратный прирост клеток, а время удвоения клеточной популяции снизить до 8,35 часа. Кроме того, применение разовой пластиковой посуды позволяет значительно сократить ручной труд и таким образом снизить стоимость производства препарата.

Другим способом увеличения культуральной поверхности стало **использование микроносителей**. Такая система позволяет использовать все преимущества суспензионного культивирования клеток. Однако из-за высокой стоимости микроносителей система не столь популярна.

Принципиальный прогресс в развитии методов культивирования клеток и вирусов, означавший решительное изменение культуральной технологии, был связан с отказом от субстрата и переходом к **суспензионному культивированию**. В настоящее время для суспензионного выращивания клеток используют биореакторы объемом от 0,5 до 8 тыс. литров (рис. 4).

Английская фирма Celltech, производящая моноклональные антитела в эрлифтных ферментерах объемом 1000 литров, сконструировала реактор объемом до 10 тыс. литров. Американская компания Wyeth Biopharma, Andover (MA, USA) для производства моноклональных антител в культуре клеток запустила 150 000 квадратных фитов производственных площадей, организованных в соответствии с правилами Надлежащей практики производства (GMP) и включающих биореакторы объемом до нескольких тысяч литров.

Таким образом, бурное развитие технологий с применением клеток в производстве препаратов для лечения или иммунопрофилактики, требует не только получения новых высокочувствительных или продуктивных культур клеток животных, но стимулирует создание новых питательных сред, а также разработки новых условий культивирования и конструирования нового оборудования, пригодного для масштабной наработки клеток.

## 2. Создание коллекций культур клеток.

### Методы контроля и паспортизации клеток

Исторически сложилось так, что после выделения первой перевиваемой линии клеток человека HeLa, полученной из карциномы шейки матки негритянки Henrietta Lask, значительно увеличилось число публикаций о получении новых линий клеток. Совершенствовались методы, число новых линий клеток росло. Следом были получены культуры клеток Нер-2, J-96, RH, KB, Fl и многие другие.

Исследователей удивляло, что линии, полученные из самых разных органов, имеют определенное сходство. Выдвигались теории, объясняющие это явление, появились термины «адаптация к условиям длительного культивирования», «спонтанная малигнизация клеток» и т.д. И только в 1960—1963 гг. было показано, что большую часть так называемых «спонтанно» измененных перевиваемых линий различного видового происхождения по иммунологическим, кариологическим и биохимическим показателям можно отнести к двум видам — человеческие (HeLa) и мышинные (L).

Именно разработка методов анализа изоферментов и дифференциальной окраски хромосом позволила поставить вопрос о контаминации линий клеток клетками HeLa и L<sub>929</sub>. Это привело к принципиальному изменению подходов к получению и контролю перевиваемых линий клеток вообще. Стало ясно, что при проведении исследований с применением культур клеток особенно большое значение приобретает проблема стандартизации линий клеток, включая идентификацию клеток или подтверждение видового соответствия, а также контроль контамина-

ции клеток как микроорганизмами, так и другими клетками.

В настоящее время в распоряжении исследователей имеются сотни линий клеток человека и животных, способных обеспечить все направления исследований. **Мнообразие линий клеток, высокая вероятность контаминации микроорганизмами и клетками других линий, наличие туморогенных и онкогенных свойств клеток делают культуры клеток небезопасными, что требует обязательного контроля клеток для получения адекватных результатов исследования или производства безопасного продукта.**

Основной успешной разработкой вирусологических и биотехнологических работ с использованием культивируемых клеток является наличие коллекций культур клеток, охарактеризованных на современном методическом уровне в соответствии с общепринятыми требованиями (паспортом) и заложенных на хранение в достаточном количестве, позволяющем длительное время обеспечивать стандартными отливками клеток развивающиеся направления исследований.

### 2.1. Крупнейшие мировые и отечественные коллекции культур клеток человека и животных

Для обеспечения научных исследований или производства хорошо охарактеризованными культурами клеток в разных странах созданы специализированные коллекции культур клеток человека, сельскохозяйственных животных, насекомых и растений. Ниже представлен пере-



Рис. 4. Производство моноклональных антител на культуре клеток животных, выращиваемых в биореакторе, компанией Wyeth Biopharma (Andover, штат Массачусетс, США)



чень наиболее крупных и известных коллекций культур клеток человека и животных.

- Американская коллекция типовых культур (АТСС, Вашингтон, США);
- Европейская коллекция культур клеток (ЕСАСС, Великобритания);
- Институт вирусологии имени Д.И. Ивановского (Москва, РФ);
- НИИ Цитологии РАН (Санкт Петербург, РФ);
- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск, РФ);
- НИИ ветеринарии РАСХН (Москва, РФ).

Наиболее крупными и известными являются Европейская коллекция клеточных культур (ЕСАСС) и Американская коллекция типовых культур клеток (АТСС), которые включают более 800 линий клеток или 450 линий и клонов клеток 43 видов животных, включая 200 штаммов фибробластов человека, и только 2 линии клеток комаров *Aedes aegypti* (АТСС-10) и *Aedes albopictus* (АТСС-15), соответственно. В Европе имеются и другие специализированные коллекции культур клеток человека и животных, как правило, это национальные коллекции клеток в разных странах.

**Всесоюзная (ныне Российская) коллекция клеточных культур (ВСКК — РККК)** была создана в 1978 г. В состав РККК вошли 9 специализированных коллекций, расположенных в разных институтах страны. Среди которых одна из крупнейших в России коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных, находится в институте

#### Паспорт культуры клеток

- Полное наименование;
- Тканевое и видовое происхождение клеток;
- Культуральные и морфологические свойства;
- Кариотип;
- Данные по криоконсервации;
- Контроль контаминации клеток;
- Подтверждение видовой идентичности;
- Вирусчувствительность клеток или их специфическая активность (продукция рекомбинантных препаратов)

Рис. 5. Параметры контроля современного паспорта, согласно данным ВОЗ

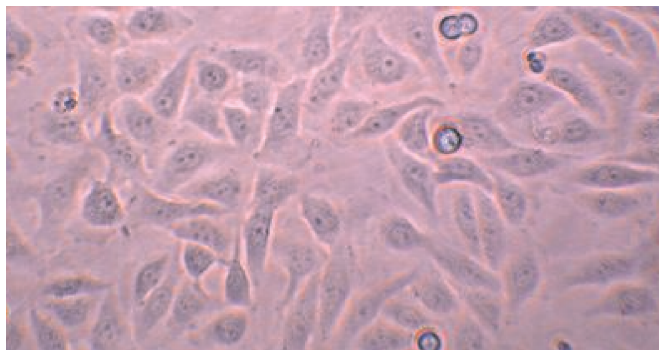


Рис. 6. Эпителиоподобные клетки линии почки быка МДВК под инвертированным микроскопом. Нефиксированный и неокрашенный препарат. Ув. х40.

вирусологии им. Д.И. Ивановского (г.Москва) и содержит 125 линий клеток животных, пригодных для вирусологических исследований.

**Коллекция культур клеток позвоночных** института Цитологии РАН (г.Санкт Петербург) включает линии клеток человека и животных; использующихся, преимущественно, для проведения научных цитогенетических исследований, имеет ряд первичных и диплоидных штаммов клеток, перспективных для исследований в области клеточной терапии.

**Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных** находится во Всероссийском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко и используется, главным образом, для проведения исследований по выявлению вирусов сельскохозяйственных животных и производства ветеринарных вакцин.

**Специализированная коллекция клеток беспозвоночных**, включающая, главным образом, линии клеток *Drosophila melanogaster* (12 культур), клетки комаров (2 линии) и других насекомых, находится в институте общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН (г.Москва). Более 30 линий клеток насекомых, собранных из разных стран или впервые полученных Т.Д. Колокольцовой, имеет коллекция культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск).

Одной из крупнейших в России специализированных коллекций остается коллекция Государственного научно-го центра вирусологии и биотехнологии «Вектор», включающая более 110 линий и культур клеток человека и животных, пригодных для проведения исследований в области вирусологии и биотехнологии. Культуры клеток охарактеризованы, идентифицированы, а паспортные характеристики изданы в виде 5 томов каталогов.

Как уже отмечалось, успешное проведение исследований с применением культивируемых клеток и получение адекватных результатов возможно только при использовании паспортизованных в соответствии с современными требованиями культур клеток. Важными параметрами при паспортизации клеток являются: контроль видовой соответствия клеток, отсутствие контаминации и культурально-морфологические характеристики.

#### 2.2. Паспортизация культур клеток

Согласно современным требованиям, **паспорт культуры клеток** должен включать: полное наименование; тканевое и видовое происхождение клеток; описание культуральных и морфологических свойств культуры; описание кариотипа, особенностей криоконсервации; данные по контролю контаминации клеток посторонними микроорганизмами, в том числе грибами, бактериями, вирусами, микоплазмами; подтверждение видовой идентичности и данные по чувствительности клеток к вирусам или их продуктивности в случае использования культур клеток в качестве продуцентов рекомбинантных препаратов.

Число линий клеток постоянно растет, часто клетки внешне трудноотличимы. Они имеют сходную морфологию и ростовые свойства. Наличие нескольких линий клеток в лаборатории, особенно занимающихся получением собственных культур, создает предпосылки не только для загрязнения клеток посторонними микроорганизмами, но и **контаминации клеток клетками других линий.**

Более того, отсутствие данных кариологического и изоферментного анализа многих имеющихся и вновь получаемых культур клеток, ставит под сомнение их видовую принадлежность.

Если контаминация бактериями, грибами, микоплазмами и некоторыми вирусами может проявлять себя явно и постоянно находится под пристальным вниманием и контролем, то контаминация клеток клетками других линий часто выпадает из сферы тщательного контроля. Опыт работы крупных коллекций мира показывает, что **уровень контаминации культур клеток млекопитающих колеблется от 20 до 30%**.

В связи с этим при паспортизации линий клеток, особенно вновь поступающих в коллекцию или долго культивируемых в лаборатории вместе с другими культурами клеток, должны быть тесты, подтверждающие видоспецифичность клеток и позволяющие идентифицировать их.

### 2.3. Контроль клеток

Для идентификации линий клеток млекопитающих чаще всего используют анализ кариотипа и изоферментного состава исследуемых клеток. В ряде случаев для идентификации клеток применяют иммунологический контроль. По мнению Green A.C. с соавторами, для идентификации линий клеток насекомых необходимы, кроме того, знания культуральных и ростовых свойств клеток, их морфология и изоферментного состава. Рассмотрим эти методы отдельно.

**Морфология клеток** часто отражает специфику ткани или органа, из которого она получена. Так клетки, полученные из тканей почек, независимо от видового происхождения, как правило, представлены эпителиоподобными клетками: VERO, CHO, МДСК, Frhk-4, МДВК и другие, а клетки других тканей, например, легкого чаще всего фибробластоподобные (DBSFCL-1, Л-68, ФЭЧ 16-1 и др.) (рис. 6, 7). Линии лимфоидных культур клеток представлены, как правило, круглыми, свободноплавающими клетками (К-562, Namalva, Raji и др.). Однако это не всегда является закономерностью и клетки легкого эмбриона человека линии ЛЭЧ эпителиоподобные или полигональной формы, а клетки почки сирийского хомячка известной линии ВНК — фибробластоподобны

В любом случае при характеристике культуры клеток, поступившей в коллекцию, в первую очередь проводят анализ морфологии нефиксированной культуры под инвертированным микроскопом (рис. 6, 7) или фиксированной и окрашенной гематоксилин-эозином после фиксации (рис. 8). Если фото живых клеток на стекле давало представление о характере роста культуры, то во втором случае позволяло наблюдать формы и размеры клеток и ядра. Количество ядрышек в ядре, а также соотношение размеров ядро/цитоплазма также являются характерными признаками линий клеток. Как видно из рис. 8, клетки линии DBSFCL-1 имеют от 2 до 3 ядрышек.

В некоторых случаях используют цветные красители, чаще **флюорохромы**, позволяющие демонстрировать некоторые особенности внутренней структуры клеток. Например, прижизненная окраска клеток акридиновым — оранжевым позволяет показать активность лизосомального аппарата, определить размеры ядра, ядрышек, наличие или отсутствие других ДНК-овых образований или включений (ДНК микоплазм и т.п.)

Как видно из рис. 9, линия клеток, выделенная из яиц куколок хлопковой совки, МБ ХС-685 характеризуется круглыми или эпителиоподобными клетками среднего размера, реже мультиполярными клетками с присутствием в ядре одного, реже двух округлых или овальных ядер с ядрышками (от 1 до 3). Отличительной особенностью культуры является наличие больших скоплений ли-

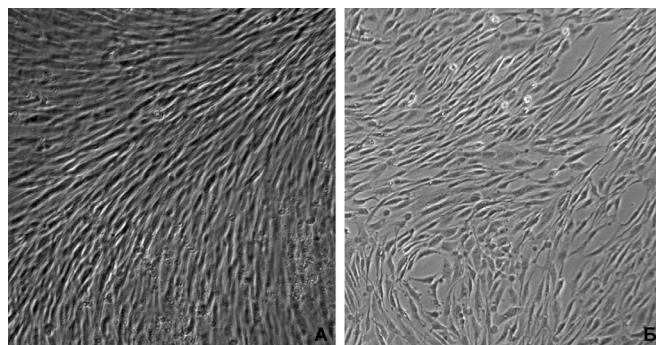


Рис. 7. Морфология первичной (А) и диплоидной (Б) культур фибробластов легкого человека. Фиксированный, неокрашенный препарат. Ув. х40об.

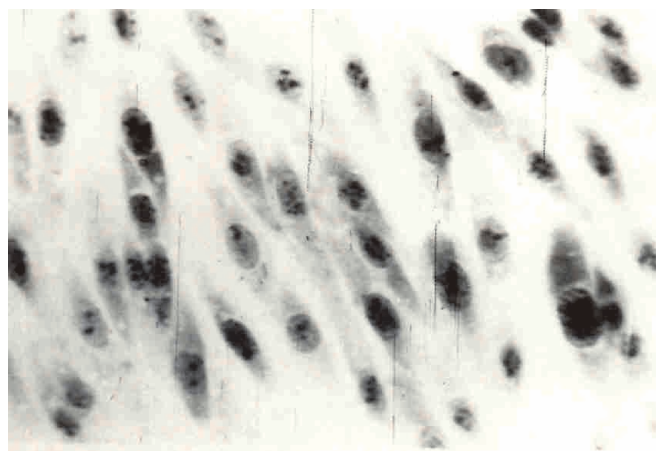


Рис. 8. Морфология культуры клеток DBSFCL-1. Окрашено гематоксилин-эозином. Ув. Х90.

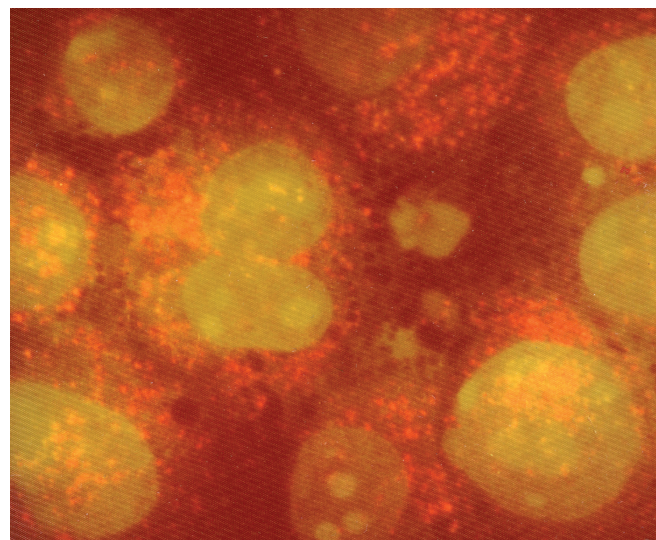


Рис. 9. Морфология клеток хлопковой совки МБ ХС-685, окрашенных акридиновым оранжевым. Ув. х90об.



зосом в виде крупных зерен, равномерно распределенных по цитоплазме.

Морфологические характеристики являются постоянным и потому отличительным признаком каждой линии клеток и вносятся в паспорт линии клеток вместе с их описанием.

**Электронно-микроскопическое обследование** клеток и внутриклеточных структур позволяет выявить дополнительные особенности культур. В качестве примера приведем здесь данные по электронно-микроскопическому анализу клеток насекомых.

По нашим данным почти все линии клеток насекомых были представлены клетками средней электронной плотности округлой, реже неправильной формы, с многочисленными или редкими микроворсинками на поверхности. В клетках комаров встречались в большом количестве

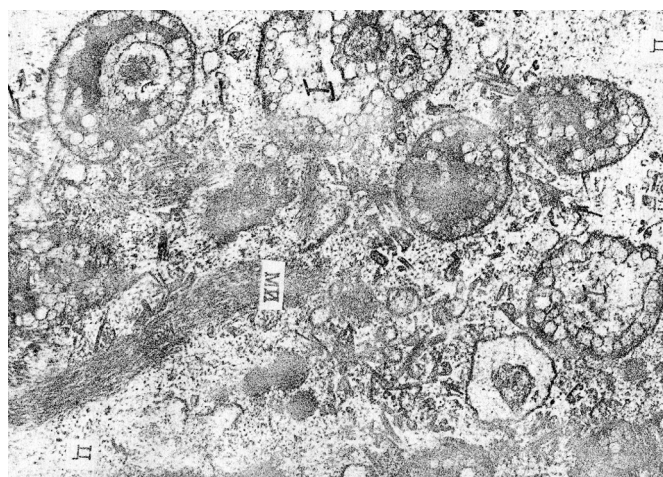


Рис. 10. Ультраструктура клетки линии SCLd-135. Увел.  $\times 10\,000$ . MC — мембранные структуры, содержащие мелкие «пузыри» диаметром 0,1–0,15 мкм; MI — микрофиламенты; стрелками обозначены мембранные пластинки, скрученные в незамкнутые трубочки



Рис. 11. Кариотип диплоидной культуры клеток легкого человека Л-68 ( $2n = 46$ )

крупные структуры типа фагосом, появлялись миелиновые фигуры.

Следует отметить, что в цитоплазме некоторых линий клеток, полученных из яичников чешуекрылых насекомых, в большом количестве наблюдались трубчатые спиральноорганизованные структуры диаметром 36 нм неизвестной природы. Иногда встречались клетки, цитоплазма которых заполнена необычными структурами: округлые, окруженные мембраной образования диаметром 2 мкм, содержащие мелкие «пузыри» диаметром 0,1–0,15 мкм; скопления электронно-плотного вещества и окруженную мембраной сердцевину, заполненную мелкозернистым содержимым, часто с трубчатыми структурами внутри (рис. 10).

Таким образом, изучение морфологии клеток проводят с помощью световой, люминесцентной и электронной микроскопии. Морфология клеток, их размеры, а также тип их роста в монослое или в суспензии являются постоянными характеристиками каждой линии клеток, что позволяет в большей степени различать культуры клеток, являясь в числе других параметров контрольным доказательством принадлежности клеток к той или иной линии.

**Кариологический анализ** основывается не только на определении соответствия видовой принадлежности кариотипа клеток путем сравнения размеров, числа и соответствия пар хромосом, но и на детальном изучении хромосомного набора клеток каждой линии. Для идентификации отдельных хромосом клеток млекопитающих используют специальные дифференциальные С- и G-окраски хромосом.

Использование методов дифференциальной окраски хромосом дает возможность идентифицировать каждую хромосому набора, причем **специфический рисунок каждой хромосомы не меняется, что позволяет определять участки или переносы части хромосом при различных хромосомных перестройках**. Комплекс маркерных хромосом может служить для характеристики гетероплоидных линий клеток и помочь в решении проблемы идентификации перевиваемых культур клеток.

В качестве примера приведем данные кариологического анализа культур клеток, поступавших в ГНЦ ВБ «Вектор» при формировании коллекции в 1980–1990-х годах. Результаты исследования кариотипа культур клеток человека показали удивительное разнообразие клеток по числу хромосом, но вместе с тем подтвердили сходство дифференциально окрашенных маркерных хромосом ряда линий с клетками HeLa.

40% клеток линии HeLa, поступившей в 1983 г. из компании «Flow laboratories» на 368 пассаже, имели 81 хромосому. Дифференциальная G-окраска метафазных хромосом позволила выделить 4 маркерных хромосомы, образованные в результате транслокации центromеры и длинного плеча хромосомы 1 на длинное плечо 3 хромосомы (1 маркер); транслокации короткого плеча 3 на длинное плечо 5 хромосомы (маркер 2); изохромосома короткого плеча хромосомы 5, встречающаяся до нескольких копий (маркер 3); и 4 маркер, сформированный из длинного плеча хромосомы 11 и одним из плеч 19. Кроме того, в клетках присутствовали еще 3 трудно идентифицируемых маркера.

33% клеток линии Нер-2 имели 76 хромосом, и маркеры 2,3,4 и 6, характерные для клеток HeLa и 2 собствен-

ных маркера. Клетки линии HeLa Ohio характеризовались модальным числом в 65 хромосом (32% клеток) и присутствием маркеров HeLa. Аналогичная картина с выявлением маркерных хромосом, свойственных культуре карциномы шейки матки HeLa, была показана для следующих культур клеток: HeLa Ohio (Flow), HeLaS, Hep-2, FL (Flow), FL, AMH, RH, KB, L-132, Chang conjunctiva, Chimp liver, L-41.

Аналогичные данные были получены многими зарубежными авторами. Именно при исследовании линий клеток человека были обнаружены уникальные маркерные хромосомы, свойственные клеткам HeLa, что позволило выделить целый ряд культур клеток человека в группу так называемых «дериватов HeLa».

Позднее были описаны маркерные хромосомы для многих линий клеток других представителей млекопитающих. На рис. 11 представлен нормальный кариотип культуры клеток, выделенной из тканей легкого человека. Кариотип характеризуется наличием 23 пар хромосом, присутствием двух X хромосом. Неизменность кариотипа в течение 33 пассажей выращивания клеток *in vitro* свидетельствует о стабильности кариотипа и характеристик культуры.

Кариотип культуры клеток MDCK соответствует кариотипу собаки *Canis familiaris*, 98% клеток имеют по 85 хромосом (Модальный класс) (рис. 12). В клетках выявлены 3 маркерные хромосомы. Данный кариотип описан в паспортных характеристиках культуры другими коллекциями и, таким образом, подтверждает соответствие клеток линии MDCK.

Сведения по кариотипу клеток насекомых крайне ограничены. Это объясняется тем, что идентификация линий клеток насекомых с помощью метода кариологического анализа вызывает затруднения у исследователей из-за чрезвычайно сложной структуры кариотипа большинства видов насекомых: большого числа и полиморфизма хромосом, отсутствия разработанных способов дифференциального окрашивания (маркирования) таких хромосом, позволяющих идентифицировать каждую хромосому набора.

Трудности связаны, главным образом, с культурами клеток чешуекрылых насекомых. Кариотип их клеток представлен, как правило, набором от 200 до 300 мелких голоцентрических хромосом (рис. 13А).

Клетки комаров имеют от 6 до 12 или 24 нормальных хромосом (рис. 13Б). Особенности кариотипа клеток комаров позволяют достоверно отличать их от других представителей насекомых, но видовое и внутривидовое их различие представляет трудности. Использование методов С-, G- и Q-окрашивания хромосом несколько расширили возможность определения видоспецифичности клеток.

Однако, как было показано другими авторами, хромосомы многих видов комаров, а именно: *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. pseudoscutellaris*, *A. alcasidi*, *A. scatoii*, *A. metallicus*, *A. annandalei* имеют одинаковую исчерченность С-полос, что делает метод непригодным для подтверждения видовой или линейной принадлежности клеток.

Таким образом, анализ кариотипа культивируемых клеток, а, главное, наличие маркерных хромосом позволяет идентифицировать конкретные линии клеток и подтверждать их видовую принадлежность, стабильность или изменчивость кариотипа в процессе культивирования.

**Анализ электрофоретической подвижности изоферментов** представляет собой простой, практически доступный и надежный метод идентификации клеток на уровне рода и вида. Показано, что полиморфизм изоферментов, присущий данному виду, является генетическим автографом каждой линии клеток. Для контроля культур клеток млекопитающих наиболее часто используются два фермента — глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (Г6ФДГ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Американские исследователи при обследовании 86 линий клеток из коллекции культур клеток животных показали, что для подтверждения вида 20 из 22 таксономических групп достаточно сравнения профилей этих двух ферментов. Аналогичные результаты были получены российскими учеными в 1980 г. при обследовании изоферментных профилей только этих двух ферментов у 40 линий клеток различного происхождения. Исключение составляли клетки обезьян и HeLa-подобные клетки, имеющие идентичную подвижность этих ферментов.

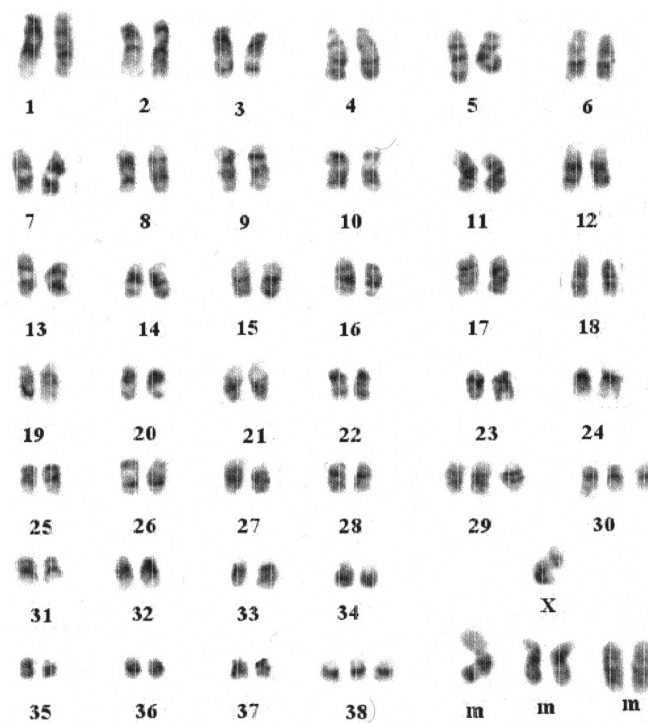


Рис. 12. Данные кариологического анализа перевиваемой культуры клеток почки собаки MDCK.  $2n = 78$ ,  $МК = 85$  (98%), Трисомия 29, 30 и 38 хромосом. Маркерных хромосом — 3

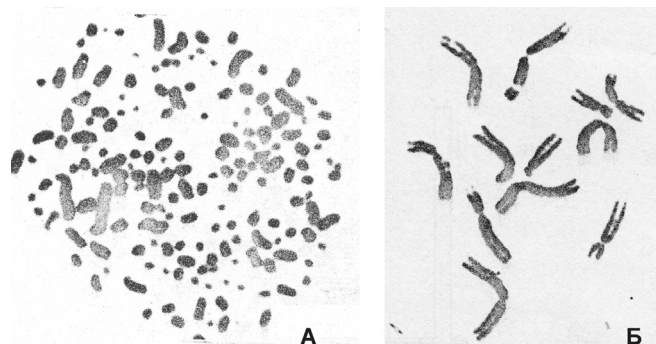


Рис. 13. Кариотип клеток насекомых: А — линии клеток непарного шелкопряда SCLd-135; Б — клеток малярийного комара *Aedes aegypti*





расти и продуцировать вирус без видимого цитопатического эффекта.

О высокой вероятности контаминации первичной или диплоидной культуры клеток свидетельствует статистика инфицированности донорского материала (органов и тканей для трансплантации), частота встречаемости вирусов СПИДа, гепатитов, ЦМВ и других вирусов человека.

**Источником контаминантов** может быть не стерильность рабочего помещения, первичный материал (ткань или орган), трипсин животного происхождения, а также инфицированная сыворотка крови животных, используемая для выращивания клеток человека или животных. Применение таких клеток в исследованиях не только приводит к получению искаженных результатов, но, прежде всего, небезопасно как для получаемого продукта, так и для исследователей, работающих с ними. В культурах клеток, кроме того, могут присутствовать онкогенные вирусы.

Техника культивирования клеток и тканей постоянно меняется, и многие методические приемы систематически модернизируются, одновременно с этим совершенствуются методы контроля клеточных культур. К сожалению, в настоящее время нет единых методов контроля, позволяющих полностью исключить контаминацию вирусами, поэтому для контроля вирусной контаминации используют несколько методов: электронная микроскопия, методы иммунодиагностики, заражение иммуносупрессивных животных и т.п.

**Контаминация культур клеток бактериями, грибами или вирусами** хорошо известна вирусологам и исследователям, работающим с культурами клеток. Но более серьезной остается проблема **микоплазменной контаминации**, обусловленная, в первую очередь, широкой распространенностью этого микроорганизма. Как показывает мировой опыт, до от 10—15% до 45—90% случаев длительно культивируемых линий клеток были заражены микоплазмами (рис. 15).

Основным **источником микоплазм** являются первичный клеточный материал, питательные среды, сыворотки, трипсин, другие культуры клеток. Из литературы известно, что до 32% серий сыворотки крупного рогатого скота содержат микоплазмы. Другой источник — люди, работающие с этими культурами, и окружающая среда: воздух, пыль, нестерильность посуды, боксового помещения и т.п.

Микрокапли, возникающие при работе с культурами, могут содержать до  $0,5 \times 10^6$  микоплазм. Такие микрокапли оседают из воздуха на посуду, рабочие поверхности и руки персонала в течение нескольких секунд и могут даже после работы с единичными инфицированными культурами вызывать тяжелое заражение рабочего пространства.

Серьезность проблемы заключается в том, что микоплазмы могут никак не проявлять себя, но вместе с тем вызывать серьезные изменения структуры и функции клеток, индуцировать хромосомные аберрации. Они влияют на синтез белков, нуклеиновых кислот, ангиогенез, клеточных мембран, индукцию туморогенных потенциалов, вызывают цитопатический эффект и гибель клеток. Наличие микоплазм в культурах может привести к значительным искажениям результатов биохимических и вирусологических исследований.

В настоящее время в литературе описано множество методов контроля микоплазменной контаминации. Од-

ним из наиболее удобных и простых в исполнении представляется метод окрашивания флюорохромами Hoechst-33258, DAPI, оливомицином. Данные красители окрашивают двуцепочечные ДНК клеток и микоплазм, которые и выявляются в виде окрашенного ядра клеток и светящихся точек, выявляющихся в межклеточном пространстве или на цитоплазме клеток (рис. 15).

Для выявления единичных микоплазм иногда используют чувствительную культуру клеток Vero. Клетки Vero отличаются большим количеством цитоплазмы и, кроме того, высокочувствительны к токсичному воздействию микоплазм.

В настоящее время появились достаточно точные методы контроля микоплазм — методы ПЦР-анализа ДНК или РНК микоплазм, позволяющие исключить многие виды микоплазм даже в единичных количествах. Однако применение данного метода не позволяет исключить все виды микоплазм, потенциально контаминирующих клеточные культуры. Оригинальным, быстрым и достаточно точным представляется метод контроля по определению потребления аденина или окраски флюорохромами.

Простым, высокочувствительным и выполнимым в любой лаборатории остается микробиологический метод посева кондиционной питательной среды после выращивания клеток на селективную микробиологическую среду для микоплазм (PPLO). Метод позволяет выявить даже единичные микоплазмы, но не выявляет виды, которые не растут на питательной среде.

Таким образом, для контроля контаминации микоплазмами необходимо использовать несколько методов, среди которых метод ПЦР-анализа, микробиологический и гистохимический методы.

Что касается **деконтаминации** или освобождения клеток от микоплазм, то это достаточно серьезная проблема. Для этого используют антибиотики, химические реагенты, либо физические методы. К последним можно отнести воздействие повышенной до 41°C температуры или частотно-резонансный метод. Согласно мнению немецких исследователей, удаление микоплазм фактически равносильно нарушению свойств клеток, либо созданию новой линии клеток. Поэтому **важно понимать эффективность методов деконтаминации, но и учитывать возможное изменение свойств клеток после обработки препаратами.**

Поскольку микоплазмы достаточно долго сохраняются в помещении после работы с контаминированной культурой клеток, то, несомненно, важным условием работы с культурами клеток должно быть разделение работ по

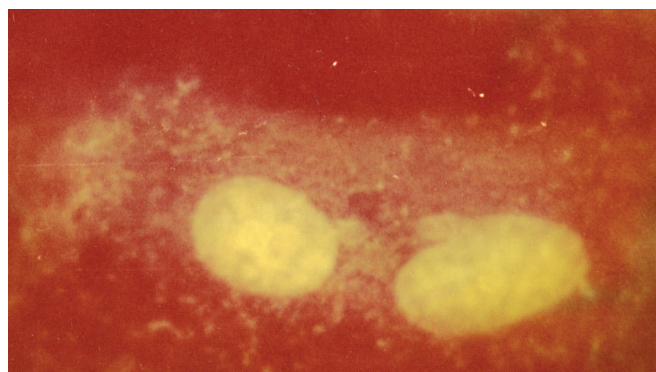


Рис. 15. Микоплазмы в контаминированной культуре клеток человека F1. Окраска флюорохромом Hoechst 33258. Ув. x90 об.



разным помещениям, либо по времени. Кроме того, в связи с высокой вероятностью передачи контаминирующих агентов необходим регулярный контроль не только культивируемых клеток, но и реагентов животного происхождения, используемых для их культивирования. Это, прежде всего трипсин, сыворотка крови животных, факторы роста и т.п. Контроль культур клеток, сывороток и, в конечном счете, вакцин чрезвычайно необходим, чтобы исключить серьезные последствия, как это было в случае с полиомиелитной вакциной, контаминированной вирусом SV-40 через сыворотку животных.

Таким образом, анализ литературы показал чрезвычайную важность проблемы контроля и паспортизации поступающих и вновь получаемых культур клеток, используемых в научных или прикладных исследованиях. **Использование неидентифицированных или контаминированных клеток в научных исследованиях приводит к получению ложных результатов.**

В связи с этим особое значение приобретает не только вопрос получения клеточных культур для обеспечения тех или иных экспериментальных исследований, но и задача сохранения таких культур с неизменными биологическими характеристиками в течение длительного времени. Поэтому вполне закономерной является постановка вопроса о создании отраслевых стандартов на клеточные культуры с регламентированными биологическими характеристиками, определяющими качественный уровень проводимых исследований и безопасность производимой продукции.

Стандарты призваны отразить главные требования к клеточному субстрату и выделить основные критерии для паспортизации перевиваемых клеточных линий и клонов. Эти проблемы **особенно** касаются культур клеток, используемых для регенеративной медицины терапии или проведения научных исследований в этом направлении.

### 3. Создание банков культур клеток и современные требования к их контролю

**Основой успешного производства стандартных препаратов является стабильность и безопасность используемой культуры клеток.** При постоянном культивировании клеток увеличивается вероятность микробной контаминации; существует риск потери интересующих нас характеристик клеток (например, снижение экспрессия поверхностного антигена или моноклональных антител); возможна генетическая изменчивость свойств, особенно в культурах с нестабильным кариотипом; потеря самой линии клеток из-за ограниченности их по числу пассажей (например, практически потеряна диплоидная линия клеток MRC-5); повышается риск контаминации клеток

клетками другой линии и, кроме того, увеличивается стоимость из-за повышения затрат на поддержание клеток.

Важнейшим преимуществом использования серийно субкультивируемых клеток для производства продуктов биотехнологии является возможность иметь охарактеризованный общий источник для каждой производственной серии, т.е. сохраняемый запас клеток или банк клеток.

Использование клеток из аттестованного банка клеток **позволяет: иметь клеточный материал постоянного или стабильного качества; использовать клетки одного пассажного уровня или в установленных пределах пассажей; культивировать клетки только, когда они нужны; сохранять характеристики исходной линии клеток.**

**Концепция** создания двухъярусного банка клеток, при котором посевной банк клеток (Master Cell Bank) используется для генерации рабочего банка клеток (Working Cell Bank) является наиболее практичным подходом для обеспечения достаточного запаса клеточного субстрата для продолжительного производства продукта.

Производители могут приготовить свои собственные банки клеток или получить из стороннего источника. В любом случае такие банки должны быть аттестованы.

В настоящее время определены требования к культурам клеток, используемым в качестве субстрата для производства медицинских и диагностических препаратов, включая производство вакцин, рекомбинантных препаратов.

Эти требования были разработаны в 1987—1989 гг. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ); американским органом контроля продуктов питания и лекарств (FDA) и национальным органом контроля (ГИСК им. Л.А. Тарасевича (табл. 1).

Согласно указанным документам, ВОЗ и национальный контрольный орган настаивают на необходимости создания системы посевных серий и рабочих или посевных банков клеток (РБК, ПБК). Клетки, используемые для производства биологических препаратов, должны быть одобрены и зарегистрированы национальным контрольным органом.

В требованиях ВОЗ и требованиях национального контрольного органа подробно описаны методы, используемые для аттестации клеток, включая описание единых характеристик. Помимо проведения морфологических тестов, изучения культуральных характеристик клеток, подчеркивается необходимость изучения безопасности клеток, что включает ряд методов выявления посторонних агентов на животных, куриных эмбрионах, или культурах клеток, контроль присутствия ретровирусов по активности обратной транскриптазы и испытание на онкогенность в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Для контроля видовой принадлежности или их идентификации, согласно национальным требованиям, используется биохимиче-

Таблица 1

#### Перечень современных требований к контролю банков клеток для производства медицинских иммунобиологических и рекомбинантных препаратов

Доклад ВОЗ о пригодности клеточных субстратов для производства биологических препаратов, Сборник технических докладов Всемирной Организации Здравоохранения, серия 747, 1987
Характеристики клеточных линий, используемых для производства биопрепаратов (FDA, CBER, Washington, 1993)
Методические указания РД 42-28-10-89, Москва, (1989)
Требования к соматическим клеткам человека и продуктам генной терапии (FDA, CBER, Washington, 1993)

ский метод изоферментного анализа состава клеток и анализ кариотипа (в том числе — цитогенетические маркеры).

Банки клеток, планируемых для использования в производстве биологических препаратов, должны быть одобрены и зарегистрированы национальным контрольным органом. Производство МИБП на перевиваемых линиях клеток должно быть основано на современной технологии, обеспечивающей высокую степень очистки готового продукта от клеточных компонентов и эндогенных вирусов. Содержание клеточной ДНК в готовом препарате должно быть не выше 100 пг на дозу.

Национальные требования, кроме того, устанавливают порядок аттестации линий диплоидных клеток, получаемых из тканей и органов эмбрионов человека и животных, оформленных в самостоятельный раздел «Получение, аттестация и контроль линий диплоидных клеток, используемых в качестве субстрата для производства медицинских препаратов».

Поскольку культура клеток используется при производстве препаратов в течение длительного пассирования, то, кроме изучения паспортных характеристик, обязательным является подтверждение стабильности свойств клеток и в большей степени их безопасность в течение срока (количество пассажей), рекомендуемого для изготовления МИБП.

Важными параметрами контроля стабильности биологических свойств клеток являются неизменность культуральных, морфологических и продуктивных свойств, а также стабильность кариотипа клеток из посевного и рабочего банков при определенном количестве пассажей.

Безопасность клеток подтверждается **отсутствием** контаминантов, **онкогенных и туморогенных** характеристик.

Изменение состава маркерных хромосом может свидетельствовать о небезопасности использования таких культур клеток, быть косвенным доказательством наличия вирусной или микоплазменной контаминации, а также появления туморогенных свойств (рис. 16). В связи с этим, Комитетом по биологическим стандартам ВОЗ было настоятельно рекомендовано проводить тщательный контроль стабильности именно этих характеристик клеток.

При увеличении числа пассажей или использовании клеток при более низких концентрациях, приводящих к увеличению числа удвоений популяции клеток, высока вероятность не только изменения кариотипа, но и, независимо от этого, появления **онкогенных свойств клеток**. Установление числа пассажей, при которых можно использовать клетки в производстве, может иметь меньшее значение, чем тщательное исследование клеток при культивировании их после установленного уровня пассажей. Последнее особенно важно учитывать при использовании в производстве перевиваемых культур клеток, имеющих неограниченный срок жизни.

Учитывая случай с культурой клеток Vero, которая приобрела туморогенные свойства на больших пассажных уровнях, ВОЗ создает посевной банк клеток VERO и настоятельно рекомендует использовать их в качестве эталона или источника клеток для создания рабочих банков для производства вакцин. Данный банк клеток Vero 10-87 хранится в специализированных коллекциях Европы (ЕСАСС) и Америки (АТСС). Ампулы из аттестованного посевного банка клеток предоставляются бесплатно.

ВОЗ обобщила материалы по потенциальному риску для людей продуктов биотехнологического производства, приготовленных в клеточных культурах, инфицированных вирусными агентами. Оказалось, что в культурах клеток могут быть вирусы с известными моделями репликации, такие, как вирус обезьян SV-40, вирусные частицы ретровирусов типа А, которые можно обнаружить методом электронной микроскопии, а также вирусные геномы или части геномов, например, вирусов гепатита В, Эпштейн—Барра и герпеса. Латентные вирусы типа герпеса и ретровирусов могут встречаться в лимфоцитах и макрофагах людей и обезьян.

Перевиваемые клеточные линии обезьян могут содержать вирусы или вирусные гены, интегрированные в ДНК. Ткани и клетки птиц могут быть контаминированы экзогенными и эндогенными вирусами. И хотя нет доказательств возможности передачи болезни людям через препараты, изготовленные в таких культурах, современная ситуация с вирусом гриппа настораживает. В настоящее время многие вакцины, например, против желтой лихорадки, кори и живая против гриппа производятся на куриных эмбрионах, которые могут содержать птичьих вирусы лейкозов.

Перечисленные факты еще раз подчеркивают **значимость контроля** контаминации клеток для подтверждения безопасности культур клеток и получаемого препарата, согласно известным требованиям. Методические приемы постоянно совершенствуются и вводятся новые методы контроля клеток. Поэтому для контроля банков клеток в настоящее время дополнительно используют методы ПЦР и ИФА-анализа.

В последние годы возникло совершенно новое направление по применению клеток человека или животных для регенеративной медицины. Это, как правило, первичные или малокультивированные клетки. Несмотря на серьезные успехи регенеративной медицины до сих пор чрезвычайно серьезными и в большей степени нерешенными остаются проблемы нормативно-правовой базы данных исследований, этики и религии, и безопасности используемого материала.

## Туморогенность культуры клеток ВНК-21 с13

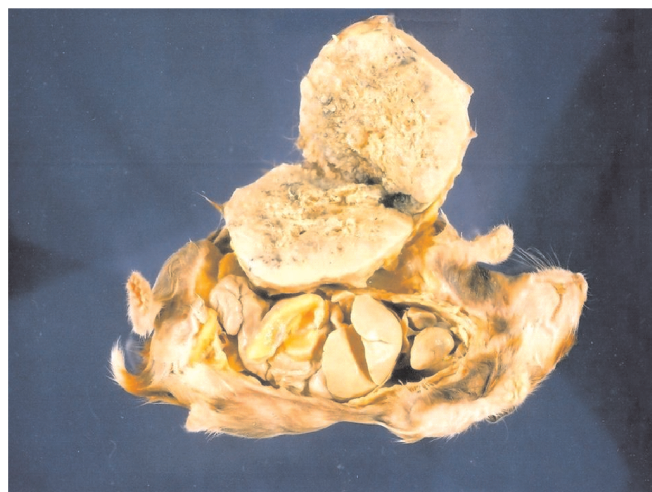


Рис. 16. Опухоль, индуцированная введением суспензии клеток перевиваемой культуры клеток, выделенной из тканей яичников сирийского хомячка ВНК-21 клон 13

## Заключение

Метод культур клеток претерпел значительные изменения и в настоящее время широко распространен. Широкое распространение метода привело к увеличению числа линий клеток, внешне трудно отличимых. Опыт работы с культурами клеток в разных лабораториях мира показал высокую вероятность контаминации клеток не только посторонними микроорганизмами, но и контаминации клеток клетками других линий. Эта проблема актуальна при наличии нескольких линий клеток в лаборатории, особенно занимающейся получением собственных культур.

Использование культур клеток с отсутствием идентификационных характеристик ставит под сомнение адекватность получаемых научных результатов. Исследование клеток в соответствии с современными требованиями позволяет идентифицировать клетки и гарантировать их качество.

Одними из важнейших направлений практического применения метода являются производство вакцинных, диагностических и лекарственных препаратов, а в последние годы особенно активно культуры клеток рассматриваются, как продукт для клеточной или регенеративной терапии. **Основой получения безопасного продукта должна быть стабильная и безопасная по характеристикам культура клеток.**

Система создания двухъярусного банка клеток, при котором создаются посевной и рабочий банки клеток, является наиболее практичным подходом для обеспечения продолжительного и стабильного производства.

Аттестация банков клеток в соответствии с современными требованиями, уделяя главное внимание контролю биологической безопасности клеток и сохранению свойств клеток при длительном культивировании, обеспечивает стабильность и безопасность производства и получаемого продукта.

Бурно развивающееся в последние годы направление по применению клеток в регенеративной медицине может стать альтернативным методом спасения больных с острой недостаточностью органов. Успешное применение метода показано как в моделях на животных, так и в медицинской практике. Широкое же применение клеток в клинике, к сожалению, ограничено из-за проблемы поиска источника клеток.

Рассматривая проблему алло- или ксенотрансплантации клеток, необходимо думать не только об эффективности лечения с помощью трансплантированных клеток, но и о безопасности пересаживаемого клеточного материала и, прежде всего, об исключении вероятности передачи различного вида инфекций.

## Глоссарий

**GLP** — надлежащая практика проведения лабораторных исследований.

**GMP** — надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов.

**HeLa** — линия «бессмертных» клеток, используемая в научных исследованиях. Была получена 8 февраля 1951 г. из раковой опухоли шейки матки Henrietta Lack.

**Банк клеток** — запас определенного количества ампул с клетками, разлитыми из одной партии суспензии клеток

и заложенных на хранение при температуре жидкого азота.

**Деконтаминация** — процесс освобождения или лечения клеток от посторонней микрофлоры.

**Дериваты HeLa** — перевиваемые культуры клеток человека, имеющие маркерные хромосомы, характерные для клеток линии HeLa.

**Кариотип** — набор хромосом, характерный для вида животного или культуры клеток.

**Кариотип** — набор хромосом, характерный для данного вида животного или культуры клеток.

**Контаминация** — заражение культуры микроорганизмов или живой ткани чужеродным биологическим материалом (вирусами, бактериями, грибами).

**Культивирование клеток** — процесс, посредством которого *in vitro* отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот и эукариот искусственно выращиваются в контролируемых условиях.

**Культура клеток** — клетки, выделенные из ткани или органа и выращиваемые в питательной среде, в условиях *in vitro*.

**Маркерные хромосомы** — набор измененных хромосом, характерных для данной линии клеток.

**Микоплазма** (лат. *Mycoplasma*) — род бактерий класса Микоплазмы (*Mollicutes*), не имеющих клеточной стенки.

**Модальный класс хромосом** — число хромосом, содержащееся в наибольшем числе клеток данной культуры.

**Пассаж** — рассев клеток, снятых с одного культурального флакона на другой.

**Пассирование** — субкультивирование, процесс переноса клеток с одного культурального флакона в другой.

**Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)** — тип плюрипотентных клеток млекопитающих.

## Список литературы

### Основная

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 1. — М.: Мир, 1994.
2. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Т. 1 / Под ред. Пальцева М.А. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», Издательство «Шико», 2009. — 272 с.
3. Биология стволовых клеток и клеточные технологии Т. 2 / Под ред. Пальцева М.А. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», Издательство «Шико», 2009. — 456 с.
4. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре / Под ред. Л.П. Дьяконова, В.И. Ситькова. — М.: Спутник, 2000. — 400 с.
5. Репин В.С., Сабурин И.Н. Клеточная биология развития / Под ред. Деева Р.В. — М.: И.С.К.Ч., 2010. — 200 с.

### Дополнительная

1. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. — М.: Мир, 1989. — 318 с.
2. Получение, аттестация и контроль линий диплоидных клеток, используемых в качестве субстрата для производства медицинских иммунобиологических препаратов: Методические указания. — М.: Минздрав СССР, 1986.
3. Колокольцова Т.Д., Царева А.А., Немцов Ю.В., Исаенко А.А., Бочкова Т.Г. Идентификация линий клеток насекомых. // Вопросы вирусологии. — 1987. — №1. — С. 87–95.
4. Царева А.А., Исаенко А.А., Немцов Ю.В., Колокольцова Т.Д. и др. Каталог перевиваемых культур клеток. Новосибирск // Депонирован в ВИНТИ. — Деп. №865-В88. — 1988. — Т. 1. — С. 1–186.
5. Радаева И.Ф., Колокольцова Т.Д., Нечаева Е.А. и др. Создание и аттестация банков перевиваемой культуры клеток МДСК для производства гриппозной вакцины // Вопросы вирусологии. — 2005. — №2. — С. 43–49.



6. Аттестация перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов. РД 42-28-10-89: Методические указания. — М.: Минздрав СССР, 1989.

7. WHO study group on Cell Substrates for Production of Biologicals. Meeting Report. — WHO Headquarters, Geneva, 11–12 June 2007.

Поступила 10.12.2014

## References

### Osnovnaja

1. Alberts B., Brey D., L'juis Dzh. i dr. Molekuljarnaja biologija kletki. T. 1. — М.: Mir, 1994.
2. Biologija stvolovyh kletok i kletochnye tehnologii. T. 1 / Pod red. Pal'ceva M.A. — М.: OAO «Izdatel'stvo «Medicina», Izdatel'stvo «Shiko», 2009. — 272 s.
3. Biologija stvolovyh kletok i kletochnye tehnologii T. 2 / Pod red. Pal'ceva M.A. — М.: OAO «Izdatel'stvo «Medicina», Izdatel'stvo «Shiko», 2009. — 456 s.
4. D'jakonov L.P. Zhivotnaja kletka v kul'ture / Pod red. L.P. D'jakonova, V.I. Sit'kova. — М.: Sputnik, 2000. — 400 s.
5. Repin V.S., Saburina I.N. Kletochnaja biologija razvitija / Pod red. Deeva R.V. — М.: I.S.K.Ch., 2010. — 200 s.

### Dopolnitel'naja

1. Freshni R. Kul'tura zhivotnyh kletok. Metody. — М.: Mir, 1989. — 318 s.
2. Poluchenie, attestacija i kontrol' linij diploidnyh kletok, ispol'zuemyh v kachestve substrata dlja proizvodstva medicinskih immunobiologicheskijh preparatov: Metodicheskie ukazanija. — М.: Minzdrav SSSR, 1986.
3. Kolokol'cova T.D., Careva A.A., Nemcov Ju.V., Isaenko A.A., Bochkova T.G. Identifikacija linij kletok nasekomyh. // Voprosy virusologii. — 1987. — №1. — S. 87–95.
4. Careva A.A., Isaenko A.A., Nemcov Ju.V., Kolokol'cova T.D. i dr. Katalog perevivaemyh kul'tur kletok. Novosibirsk // Deponirovan v VINITI. — Dep. №865-V88. — 1988. — T. 1. — S. 1–186.
5. Radaeva I.F., Kolokol'cova T.D., Nechaeva E.A. i dr. Sozdanie i attestacija bankov perevivaemoj kul'tury kletok MDCK dlja proizvodstva gripoznoj vakciny // Voprosy virusologii. — 2005. — №2. — S. 43–49.
6. Attestacija perevivaemyh kletochnyh linij — substratov proizvodstva i kontrolja medicinskih immunobiologicheskijh preparatov. RD 42-28-10-89: Metodicheskie ukazanija. — М.: Minzdrav SSSR, 1989.

Received 10.12.2014

## ***Culture of human and animal cells: isolation, cultivation, cryopreservation and control***

**Kolokoltsova T.D.<sup>1,2</sup>, Saburina I.N.<sup>1,2</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> — FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», Moscow, Russia

<sup>2</sup> — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

*The progress in modern biology, immunology and medicine is largely due to the creation of conditions for in vitro cultivation of different origin cells, to the discovery of stem and progenitor cells, and the high prospect of their application in research and production of preparates for immunization, diagnosis and treatment. The presence of several cell cultures in the laboratory, especially dealing with obtaining their own cell culture, a prerequisite not only for cell contamination by foreign microorganisms but contamination by cells of other cell lines. These findings underscore the importance of creation of specialized cell culture collections and characterization of incoming and newly produced cell cultures used in research or in applied research. The stability of the production of drugs for immunization, diagnosis or treatment largely depends on the stability and biosafety of used cells. Standardized and certified cell culture is the basis for producing a safe product. Creation a system of well characterized and controlled cell collections and certified cell banks suitable for research, development of new production technologies for medicines and treatment will ensure quality assurance, stability and security cells. In this review current approaches and requirements for control of cell cultures, the importance of the creation and control of seed and working cell banks used in scientific research and production, diagnosis and treatment are considered.*

**Keywords:** cell culture, cultivation, control, safety, contamination, identification, seed and working banks, attestation, cell culture collection