

# КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК MDCK В БЕССЫВОРОТОЧНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН<sup>1</sup>

## THE CULTIVATION OF MDCK CELL IN SERUM-FREE CULTURE MEDIUM TO OBTAIN INFLUENZA VACCINES

**E. Nechaeva  
I. Radaeva  
T. Senkina  
N. Dumchenko  
I. Lipatova**

*Summary.* VectorVac-PS2 serum-free culture medium was developed for the cultivation of MDCK cells and vaccine strains of the influenza virus to create vaccines. The serum-free nutrient medium VectorVac-PS2, when culturing MDCK cells, has high proliferative activity. The production of vaccine strains of influenza virus in cell culture in the VectorVac-PS2 medium is comparable to the production of these strains in serum-free medium SFM4MegaVir. Nutrient medium VectorVac-PS2 can be used in the production of influenza vaccines.

*Keywords:* viruses, cells, serum-free culture media, vaccines.

**Нечаева Елена Августовна**

К.м.н., ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

[nechaeva@vector.nsc.ru](mailto:nechaeva@vector.nsc.ru)

**Радаева Ирина Федоровна**

Заведующая лабораторией, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

[radaeva@vector.nsc.ru](mailto:radaeva@vector.nsc.ru)

**Сенькина Татьяна Юрьевна**

Главный специалист, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

[senkina@vector.nsc.ru](mailto:senkina@vector.nsc.ru)

**Думченко Наталья Борисовна**

Н.с., ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

[dumchenko@vector.nsc.ru](mailto:dumchenko@vector.nsc.ru)

**Липатова Ирина Павловна**

Технолог, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

[lipatova\\_ip@vector.nsc.ru](mailto:lipatova_ip@vector.nsc.ru)

*Аннотация.* Разработана бессывороточная питательная среда ВекторВак-ПС2 для культивирования клеток MDCK и вакцинных штаммов вируса гриппа с целью создания вакцин. Бессывороточная питательная среда ВекторВак-ПС2 при культивировании клеток MDCK обладает высокой пролиферативной активностью. Продукция вакцинных штаммов вируса гриппа в культуре клеток в среде ВекторВак-ПС2 сравнима с продукцией этих штаммов в коммерческой бессывороточной среде SFM4MegaVir. Питательная среда ВекторВак-ПС2 может быть использована в производстве гриппозных вакцин.

*Ключевые слова:* вирусы, клетки, бессывороточные питательные среды, вакцины.

<sup>1</sup> Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-14/16

## Введение

**В**ажнейшими условиями успешного культивирования вирусов следует считать подбор соответствующей чувствительной клеточной системы и обеспечение ее высокой жизнеспособности и продуктивности в течение всего срока, необходимого для наработки вирусосодержащего материала. Первостепенное значение при этом имеют три обстоятельства: природа и свойства клеток, среды, на которых осуществляется их культивирование, и метод культивирования. Внеклеточная среда должна обладать всем необходимым для выживания и роста, т.е. обеспечивать клетки питательными и гормональными факторами, а также факторами стромы [1].

Классические среды для культур клеток были разработаны как среды основные. Питательные среды в подавляющем большинстве включают воду, неорганические соли, низкомолекулярные синтетические вещества, сывороточные или серозные компоненты. Неорганические соли создают необходимое осмотическое давление, ионный баланс, определенный pH и буферную емкость среды. Группа компонентов с низкой молекулярной массой, растворимых в воде, число которых в ряде прописей сред достигает 60, содержит энергетический источник, как правило, глюкозу, необходимые аминокислоты и витамины. В более сложные среды включают также незаменимые аминокислоты, расширяют круг витаминов, вводят коэнзимы, промежуточные метаболиты, микроэлементы. Подбор состава этих компонентов строится на основе учета особенностей метаболизма клеток в культуре и их сбалансированного взаимодействия.

Необходимой составной частью большинства питательных сред продолжает оставаться группа компонентов, входящих в состав сыворотки. Несмотря на длительные усилия многочисленных групп исследователей, создание полностью химически определенной питательной среды, которая была бы способна поддерживать рост разнообразных клеток в течение длительного времени, остается невоплощенной мечтой. Сыворотка необходима как для роста, так и для длительного прикрепления клеток к подложке, и выполняет целый набор важных функций: стимулирует усвоение регуляторных молекул; воздействуя на клеточную мембрану, участвует в регуляции плотности культуры и контактной ингибиции; стимулирует синтез ДНК; регулирует внутриклеточное содержание необходимых для роста клеток питательных компонентов; регулирует уровень внутриклеточных циклических нуклеотидов, посредством чего, в частности, стимулирует фосфорилирование ядерных белков; активирует ассоциированные с мембраной системы протеаз; играет роль носителя для низкомолекулярных компонентов и др. Различные клетки могут

нуждаться в разных компонентах сыворотки — глобулинах, стероидных гормонах, инсулине, фетуине.

Природа ростовых факторов сыворотки пока не раскрыта, и добавление 5–10% сыворотки крови животных остается неизбежной необходимостью. Это особенно беспокоит специалистов по производству вакцин, т.к. в результате вакцинные препараты содержат примеси не только в виде белков сыворотки, но и белки вирусов, контаминирующих сыворотку, а затем и культуры клеток. Кроме потенциальной возможности контаминации, использование сыворотки во время процесса клеточной пролиферации имеют место и другие недостатки, такие, как вариация качества и высокая цена. Поэтому требования чистоты и безопасности биологических продуктов, предъявляемые различными ведомствами, могут быть эффективно достигнуты только с помощью бессывороточных технологий. В связи с этим в последние два десятилетия наблюдается большой прогресс в развитии бессывороточных питательных сред (БС) для культур клеток млекопитающих. Использование БС для культивирования клеток позволяет значительно уменьшить риск контаминации.

Универсальной БС для всех типов клеток не существует. Накопленный опыт показывает, что должны быть исследованы потребности для каждой культуры в отдельности, поэтому для каждого типа клеток разрабатываются специальные среды [2]. Состав используемой питательной среды является фактором, оказывающим огромное влияние на клеточный метаболизм и, следовательно, на выход вируса. Если состав основных вирусологических питательных сред приводится в каталогах большинства коммерческих компаний, то прописи специализированных БС недоступны для широкого использования. Известны БС MDSS2, MDSS2N (коммерческое название Axcevir-Vero), SFM4MegaVir для культивирования клеток MDCK и Vero, которые на сегодняшний день являются наиболее перспективным субстратом для производства гриппозных вакцин [3, 4]. Использование таких сред позволяет культивировать клетки MDCK и Vero в биореакторах в БС без добавления сыворотки, и таким образом вирусосодержащая жидкость свободна от контаминантов, которые могут присутствовать в сыворотке животных.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана БС ВекторВак-ПС2 для культивирования клеток MDCK и вакцинных штаммов вируса гриппа [5].

## Цель исследования

Определение пригодности БС ВекторВак-ПС2 для культивирования клеток MDCK и создания гриппозной вакцины.

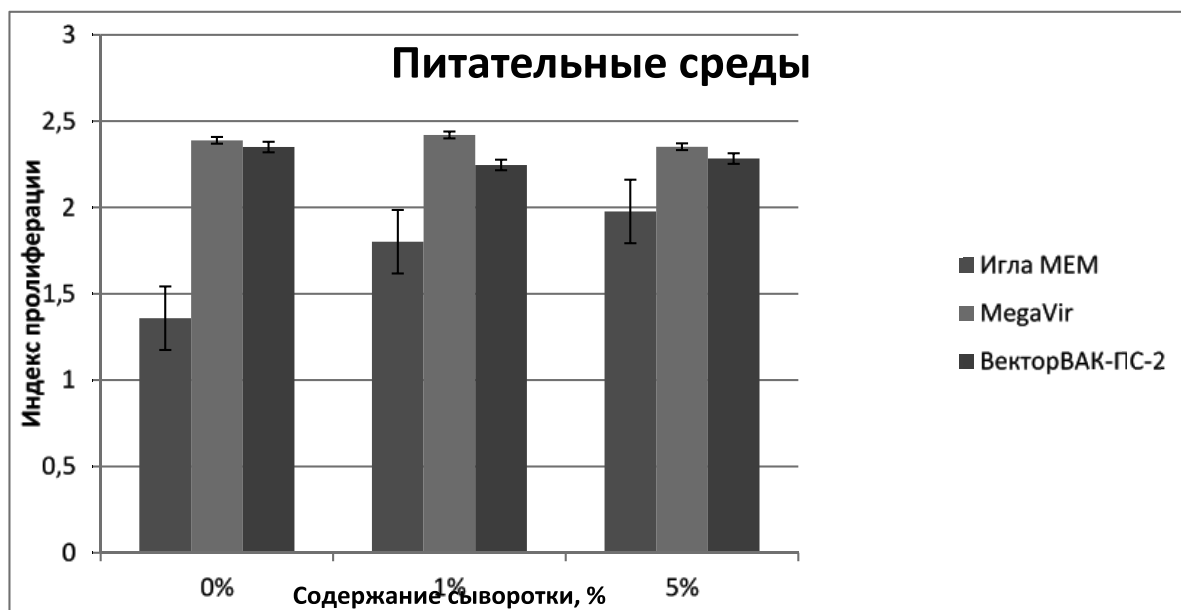


Рис. 1. Влияние состава ростовой питательной среды на жизнеспособность клеток MDCK

## Материалы и методы

**Культивирование клеток.** В работе использовали перевиваемую линию клеток почки самки коккер-спаниеля MDCK из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки культивировали в культуральных флаконах объемом 250 мл (TPP, Швейцария), в качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла MEM (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) с 1–5% сыворотки крови плодов коровы (Gibco, США). После прикрепления клеток проводили смену среды на питательные среды SFM4MegaVir (HyClone, США), ВекторВак-ПС2, Игла MEM (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и продолжали культивировать клетки в течение 72 часов.

**Определение жизнеспособности и пролиферативной активности клеток.** Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [6]. Культуру клеток MDCK в концентрации  $5 \times 10^3$  в 100 мкл среды Игла MEM, содержащей 5% сыворотки крови плодов коровы, помещали в 96-луночный планшет (Costar, США) и инкубировали 24 ч при 37 °C в CO<sup>2</sup>-инкубаторе. После прикрепления клеток к подложке проводили смену среды на перечисленные выше питательные среды, клетки инкубировали в течение 48 ч при тех же условиях. Затем в лунки вносили по 5 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (Sigma, США), инкубировали 4 ч. По окончании инкубации добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (Вектон, Россия) и определяли жизнеспособность клеток по ин-

тенсивности окраски раствора формазана, измеряя его оптическую плотность в лунках на микропланшетном ридере Tecan Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 492 нм.

Изучение пролиферативной активности клеток проводили при культивировании в различных питательных средах с добавлением и без добавления сыворотки. Клетки культивировали во флаконах вместимостью 250 мл (TPP, Швейцария). Посевная концентрация составляла 1,0г

Культивирование вакцинных штаммов вируса гриппа в клетках MDCK. Культуру клеток MDCK культивировали в культуральных флаконах объемом 250 (TPP, Швейцария), в качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла MEM (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») с 5% сыворотки крови плодов коровы (Gibco, США). После прикрепления ростовую среду сливали, клетки заражали вакцинными штаммами вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), A/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 с множественностью заражения 0,01–0,001 ЭИД<sub>50</sub>/0,5 мл и далее продолжали культивирование клеток в питательной среде SFM4MegaVir (HyClone, США) или питательной среде ВекторВак-ПС2. На 3 сутки проводили учет специфической активности вируса гриппа по цитопатическому действию (ФС.3.3.1.0027.15 «Вакцина гриппозная живая») [7].

Обработку результатов исследований проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики [8]. Достоверность различия средних ве-

Таблица 1. Продукция вакцинных штаммов вируса гриппа в культуре клеток MDCK

Поддерживающая питательная среда	Специфическая активность вируса гриппа, Ig ЭИД /0,5 мл		
	A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)	A/17/Швейцария/2010/1 (H3N2)	B/60/Пхукет/2013/26
Игла MEM + 5% сыворотки	7,0±0,5	6,3±0,5	6,0±0,5
БС SFM4MegaVir	9,0±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5
БС ВекторВак-ПС2	8,5±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5

личин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Значимой считалась разница при уровне погрешности не выше 5% ( $p < 0,05$ ) [8].

### Результаты и обсуждение

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана БС ВекторВак-ПС2 [5]. Питательная среда ВекторВак-ПС2 представляет собой растворенную в очищенной воде смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, микроэлементов, индикатора фенолового красного и других компонентов, простерилизованную фильтрованием через систему мембранных фильтров с конечным размером пор не более 0,22 мкм. В состав среды введены дополнительно микроэлементы (соли кадмия, кобальта, цинка, никеля, селена, молибдена), пируват натрия, витамины B12 и E, олеиновая кислота, цистеин, глутатион, пролин, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота (всего 45 компонентов), рекомбинантный инсулин человека, а также увеличена концентрация лейцина, фенилаланина, триптофана, лизина по сравнению с питательной средой Игла MEM.

Среда ВекторВак-ПС2 — прозрачная жидкость красновато-оранжевого цвета, без опалесценции и осадка, pH среды варьирует от 7,1 до 7,5, буферная емкость не менее 3,0 мл, содержание хлор-ионов колеблется в пределах 4,60–5,62 г/л, глюкозы — в пределах от 3,0 до 5,1 г/л, количество аминного азота не менее 0,08 г/л. Питательная среда стерильна, антибиотиков и консервантов не содержит.

Исследованы биологические свойства среды ВекторВак-ПС2 для клеток MDCK. В качестве контроля применяли питательную среду Игла MEM и среду SFM4MegaVir, используемую в производстве гриппозных вакцин. Сравнительное изучение жизнеспособности клеток в БС ВекторВак-ПС2 и БС SFM4MegaVir оценивали с помощью МТТ-теста. Показано, что жизнеспособность клеток в БС ВекторВак-ПС2 сравнима с коммерческой БС SFM4MegaVir и превосходит среду Игла MEM (рис. 1).

Проведена оценка пролиферативной активности клеток MDCK, культивируемых в средах с добавлением и без добавления сыворотки крови плодов коровы. При культивировании в питательных средах Игла MEM и БС ВекторВак-ПС2 с добавлением 5% и 1% сыворотки ростовая активность клеток MDCK сопоставима, клетки формируют монослой на 2–3 сутки роста, монослой состоит из эпителиоподобных клеток с крупными ядрами овальной и крупной формы, в ядре от 1 до 5 ядрышек, цитоплазма мелкозернистая.

При культивировании клеток в среде SFM4 MegaVir с добавлением 5% и 1% сыворотки наблюдается изменение морфологии клеток, клетки увеличиваются в размерах, образуют тяжи, пролиферативная активность культуры снижена.

Культура клеток MDCK, пассируемая в питательной среде Игла MEM без добавления сыворотки, монослой не образовывала, клетки оседали, но не прикреплялись к подложке, при этом наблюдались единичные распластанные и делящиеся клетки, процесс пролиферации отсутствовал. Использование питательной среды SFM4 MegaVir хотя и приводило к изменению морфологии культуры клеток, монослой был представлен тяжами крупных распластанных на подложке клетках, пролиферативная активность которых составляла 2,0.

БС ВекторВак-ПС2 при культивировании клеток MDCK обеспечивает рост клеток, клетки имеют типичную для данной культуры морфологию, формируют монослой на 2–3 сутки роста, сохраняют высокую пролиферативную активность (индекс пролиферации культуры клеток составляет 3,2).

При культивировании вакцинных штаммов вируса гриппа в клетках MDCK показано, что продукция вируса гриппа в культуре клеток MDCK в БС ВекторВак-ПС2 сравнима с продукцией вируса в среде SFM4MegaVir (табл. 1).

## Заключение

Разработана БС ВекторВак-ПС2 для культивирования клеток MDCK и вакцинных штаммов вируса гриппа с целью создания вакцин. В состав среды включен основной компонентный состав, применяемый для получения питательной среды Игла MEM, при этом в состав среды введены дополнительно компоненты. БС ВекторВак-ПС2 при

культивировании клеток MDCK обеспечивает рост клеток, клетки имеют типичную для данной культуры морфологию, формируют монослой на 2–3 сутки роста, сохраняют высокую пролиферативную активность. Продукция вакцинных штаммов вируса гриппа в культуре клеток MDCK в БС ВекторВак-ПС2 сравнима с продукцией этих штаммов в среде SFM4MegaVir. БС ВекторВак-ПС2 может быть использована в производстве гриппозных вакцин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Трухан И. С. Питательная среда как ключевой фактор культивирования клеток млекопитающих // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2018. — № 12–1. — С. 165–172;
2. Hossler P, Racicot C., McDermott S., Fann J. Efficient and effective supplement screening for the development of chemically defined media in cell culture: Patent USA US2010/0129727. — 2012.
3. Kluge S., Benndorf D., Genzel Y., Schafenberg K. Monitoring changes in proteome during stepwise adaptation of a MDCK cell line from adherence to growth in suspension // Vaccine. — 2015. — Vol. 33. — P. 4269–4280.
4. Mattos D., Silva M., Gaspar L., Castilho L. Increasing Vero viable cell densities for yellow fever virus production in stirred-tank bioreactors using serum-free medium // Vaccine. — 2015. — Vol. 33. — P. 4288–4291.
5. Технические условия № 20.59.52–084–05664012–2019 «Питательная среда для культур клеток бессывороточная жидкая ВекторВак-ПС2».
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of Immunological Methods. — 1983. — Vol. 65 (1–2). — P. 55–63.
7. Фармакопейная статья ФС.3.3.1.0027.15 «Вакцина гриппозная живая». Государственная Фармакопея 13. — 2015. — Т. 3. — С. 993–1008.
8. Ашмарин И.П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962. — 180 с.

© Нечаева Елена Августовна (nechaeva@vector.nsc.ru), Радаева Ирина Федоровна (radaeva@vector.nsc.ru),  
Сенькина Татьяна Юрьевна (senkina@vector.nsc.ru), Думченко Наталья Борисовна (dumchenko@vector.nsc.ru),  
Липатова Ирина Павловна (lipatova\_ip@vector.nsc.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Кольцово, Новосибирская область