

**ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК НА ПРИСУТСТВИЕ
В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ЦИТОКИНОВ**

Э.М. Плотникова, д-р вет.н., доцент

И.А. Нестерова, младший научный сотрудник

Р.Н. Низамов, до-р вет.н., профессор

**ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности»**

vnivi@mail.ru

В настоящее время в медицине и ветеринарии нашли широкое применение иммуномодуляторы нового поколения – цитокины.

Цитокины активны в очень малых концентрациях, они регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной системы.

Учитывая на высокую биологическую активность для клеток животного, растительного и микробного происхождения *in vivo* и *in vitro*, мы провели настоящие исследования, целью которых было изучение возможности использования цитокинов в качестве активаторов метаболизма культур клеток животных *in vitro* для репродукции на них вирусов.

В опытах использовали культуры клеток MDBK и ВНК -21/13-02, полученные из коллекции культур клеток ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ». Для выращивания культур клеток использовали питательные среды: Игла МЕМ, раствор Версена, трипсина, Хэнкса, сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС), сыворотки крови плодов (СКПК). В качестве активаторов метаболизма клеток использовали коммерческие цитокины: IL - 3, IL - 6, колоностимулирующий фактор – G - CSF производства ООО «Цитокин» (Санкт - Петербург). Экспериментальным путем определяли стимулирующие и ингибирующие дозы цитокинов и добавляли в среды с культурами клеток из расчета 30 до 500 пг/см³.

Установлено, что из испытанных классов цитокинов наиболее активным оказался интерлейкин – 6 (IL - 6), которой при внесении в ростовую среду в концентрации 30 - 60 нг/ см³, оказывал метаболизмстимулирующий эффект, обеспечивая индекс пролиферации клеток линии MDBK в 1,33 раза и линии клеток ВНК - 21/13 – 02 - в 1,17 раза соответственно.

Ключевые слова: КУЛЬТУРА КЛЕТОК, ЦИТОКИНЫ, АНТИГЕНЫ, ГОМОГЕННОСТЬ, КОНФЛЮЭНТНЫЙ МОНОСЛОЙ

Введение. К системе цитокинов в настоящее время относят около 200 индивидуальных полипептидных веществ [2, 9, 10]. Все они имеют ряд общих биохимических и функциональных характеристик, среди которых важнейшими считаются следующие: плейотропность и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, проведение сигнала путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами, формирование цитокиновой сети [3, 7, 11]. Учитывая, что для длительного культивирования клеток крови и стволовых клеток костного мозга необходим ряд клеточных факторов, включающих цитокины (SCF, IL-3, IL - 6.G - CSF) [9], использование полимеров (поли - (И), поли - (С) и ДЭАЭ – декстрана), являющихся индукторами цитокинов и интерферона [5], позволили бы достичь значительных успехов в биотехнологии, клеточной и генной инженерии.

Известно, что в настоящее время эффективными, стимулирующими рост средствами являются, например, рекомбинантные цитокины (интерлейкины, эритропоэтин, колониестимулирующие факторы), производные гликозаминогликанов (D - глюконовая кислота, N -ацетилнейраминавая кислота, глицирам), эпидермальный фактор роста, гепаринсвязывающие факторы роста и многие другие [6].

Цитокины оказывают влияние практически на все клетки, воздействуя на большинство процессов, протекающих в организме [1, 8].

Первые методы по обнаружению цитокинов были связаны с определением их активности, культивированием иммунокомпетентных клеток и клеточных линий.

Использование цитокинов имеет ряд преимуществ перед другими препаратами (вакцины, сыворотки): во – первых, небольшие дозы цитокинов индуцируют интенсивный иммунный ответ и запускают синтез собственных медиаторов; во – вторых, многие цитокины обладают полифункциональностью (например, интерферон – ИНФ), оказывая противовирусное, антибактериальное, противоопухолевое действие, в - третьих, применение цитокинов может сочетаться с другими медиаторами, вакцинами, антибиотиками, сыворотками и т.д. [4]. Согласно данным ряда исследователей, цитокины представляют собой регуляторные пептиды, которые продуцируются почти всеми кариотическими клетками.

Поэтому есть основание предположить, что цитокины могут быть использованы в качестве ростстимулирующего фактора при культивировании клеток животных в искусственных условиях (in vitro) для репродукции вирусов при изготовлении вакцинных препаратов.

Однако эти исследования единичны и поэтому не дают полного представления о роли цитокинов в клеточной биотехнологии.

С учетом актуальности проблемы, проводили настоящие исследования, целью которых было изучение возможности использования цитокинов в качестве активаторов метаболизма культур клеток животных in vitro для репродукции на них вирусов.

Материалы и методы исследований. В исследованиях использовали питательные среды: Игла МЕМ, раствор Версена, трипсина, Хэнкса, сыворотку крови крупного рогатого скота (СККРС), сыворотку крови плодов коровы (СКПК). Культуры клеток пересевали с коэффициентом пассирования 1:2 – 1:3. В качестве паспортизированных клеточных культур использовали 2 линии перевиваемых клеток: MDBK, ВНК 21/13 - 02, полученные из коллекции культур клеток ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Рабочие растворы цитокинов готовили согласно патенту РФ [4].

Результаты исследований. Влияние цитокинов на культуры клеток изучали методом их совместного культивирования после 24 - часового культивирования, клеточный монослой исследовали с помощью инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse TS 100) по следующим параметрам: процент покрытия поверхности, форма клеток, количество клеточных агрегатов.

Результаты оценки влияния испытуемых цитокинов на культуры клеток представлены на рисунке 1.

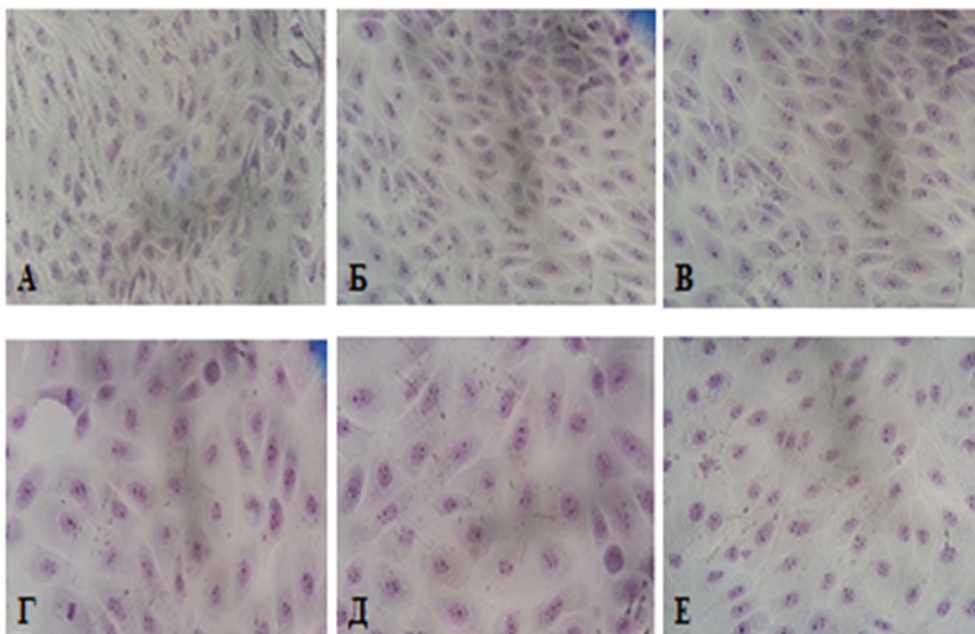


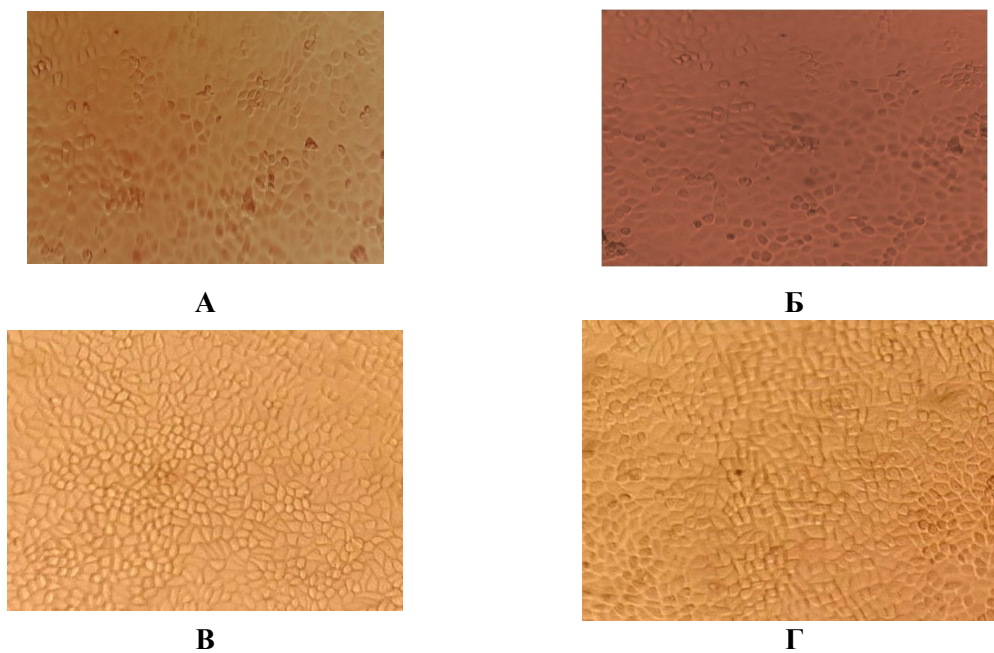
Рис. 1 – культуры клеток: ВНК- 21 – 13/02 – А – контроль, Б – IL -6, В- G-CSF; MDBK – Г - контроль, Д- IL – 6, Е – G – CSF; (об.10×, ок. 7×, окраска по Романскому - Гимза)

Из представленных на рисунке данных видно, что клетки, выращенные в цитокинсодержащей среде, имели форму, характерную для данного вида клеток с четко выраженными границами, без признаков дегенерации и морфологически не отличались от клеток, выращенных в контрольной среде. Монослой состоял из эпителиоподобных, плотно прилегающих друг к другу клеток, пролонгированной формы без зернистости цитоплазмы.

Клетки при пересеве с коэффициентом 1:2 - 1:3 формировали конфлюэнтный монослой на 3 - 4 сут культивирования.

Клетки, выращенные в экспериментальной ростовой среде, имели эпителиоподобную форму, характерную для изучаемого вида клеток животных.

Результаты влияния цитокинов на морфологию перевиваемых культур клеток ВНК - 21/13 - 02 MDBK представлены на рисунке 2.



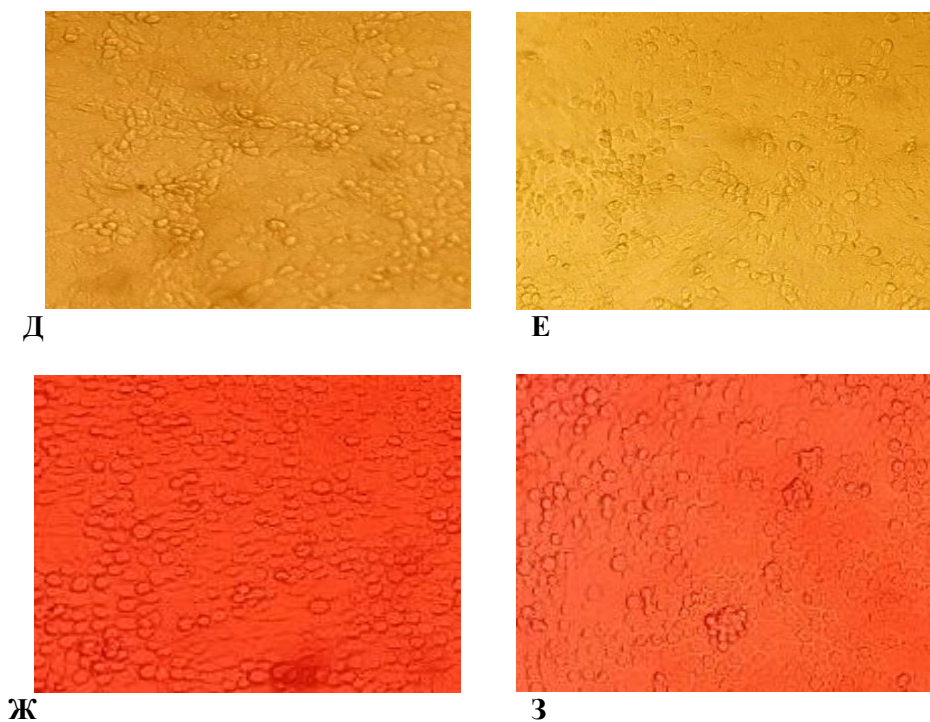


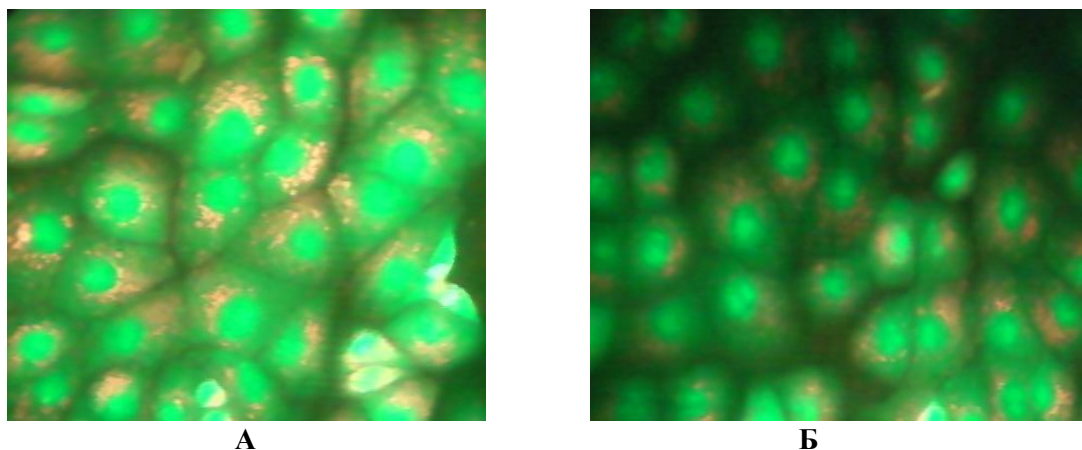
Рисунок 2. – Культуры клеток ВНК - 21/13 - 02 и MDBK, выращенные в цитокинсодержащей среде: А, Б – контроль; В, Г – 60 пг/ см³ IL - 6; Д, Е – 250 пг/см³ IL - 6; Ж, З – 500 пг/ см³ IL - 6 (об. 10×, ок. 7×). В контроле (А, Б) просматривается целостный монослой клеток.

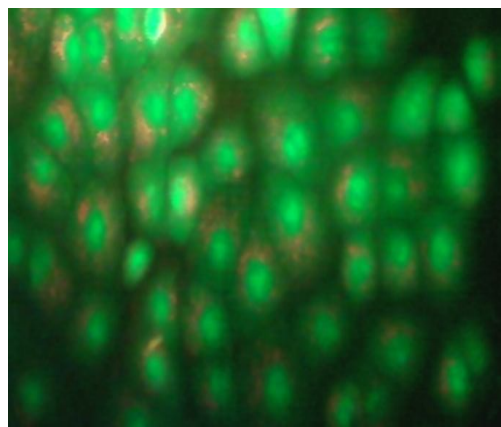
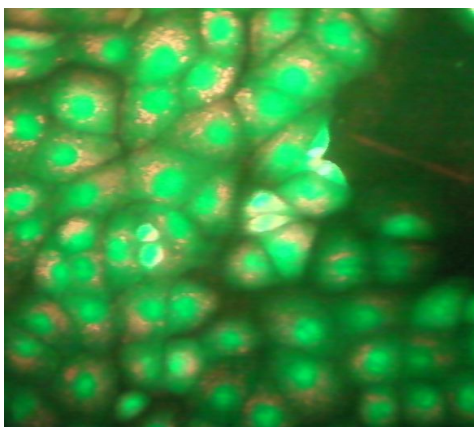
Также наблюдается морфологическая гомогенность монослоя. Плазматическая мембрана, ограничивающая клетку, имеет четкие выраженные границы.

При воздействии IL - 6 в концентрации 60 пг/см³ (В, Г) наблюдалось улучшение качества монослоя. Плазматическая мембрана имела более четкие границы, плотный однородный монослой. На рисунке 2 (Д, Е) в монослое клеток при воздействии происходят поверхностные изменения клеточной морфологии, отсутствует выраженный клеточный монослой, слабо выражена плазматическая мембрана, что указывает на ослабление динамических процессов эффективного прикрепления, расплывания, пролиферации и дифференцировки.

При увеличении дозы IL – 6 до 500 пг/см³ (Ж, З) наблюдается большое количество клеток, которые имеют измененную форму, что свидетельствует о подавлении процесса деления и увеличении количества гибнущих клеток.

Результаты окрашивания акридиновым оранжевым монослоя культур клеток ВНК - 21/13 - 02 и MDBK, выращенных в цитокинсодержащей среде (60 пг/см³), представлены на рисунке 3.





В

Г

Рисунок 3. – Люминесцентная микроскопия. Окраска акридиновым оранжевым: А - перевиваемая линия клеток MDBK (контроль); Б - перевиваемая линия клеток MDBK (цитокинстимулированная); В - перевиваемая линия клеток ВНК - 21/13-02 (контроль); Г – перевиваемая линия клеток ВНК – 21/13 – 02 (цитокинстимулированная) – ок.10,×об.

При люминесцентной микроскопии препаратов культур клеток MDBK и ВНК - 21/13-02 отмечается интенсивная люминесценция молекулярных компонентов. Зеленое свечение в большой степени излучает окрашенная флуорохромом ДНК, а оранжево – красное свечение – РНК. На рисунке 3 (А, Б) в экспериментальных образцах клеточного монослоя, окрашенного акридиновым оранжевым, мертвых клеток не выявлено.

Ядра в клетках, выращенных в средах с добавлением цитокинов, имеют ровные контуры, клетки с кариорексисом и кариопикнозом отсутствуют. Клетки с 2 и более ядрами в экспериментальном монослое не выявлены, что свидетельствует о нормальном митозе клеток.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований установлена оптимальная метаболитстимулирующая концентрация ИЛ - 6 - 30 - 60 пг/см³ обеспечивающая стимуляцию метаболизма клеток линии MDBK и ВНК – 21/13 – 02 с индексом пролиферации клеток в 1,33 раза и 1,17 раза соответственно по сравнению с контролем.

Список использованных источников

1. Авдеева Ж. И. Цитокины и вакцины /Ж. И. Авдеева, С. Е. Акользина, Н. А. Алпатова, Н.В. Медунин // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2009. - №3. - С. 22- 27.
2. Ада Г. Вакцины, вакцинация и иммунный ответ / Г. Ада, А. Рамсей: пер. с англ. – М.: Медицина, 2002. – 344 с.
3. Бельмер С. В. Значение цитокинов в патогенезе воспалительных заболеваний толстой кишки у детей / С.В. Бельмер, А.С. Симбирцев, О.В. Головенко и др. // РМЖ. – 2003. – Т.11, № 3. – С. 17 - 22.
4. Патент RU 2715336 Класс МПК: C12N 5/00 Способ стимуляции метаболизма культур клеток MDBK для репродукции вирусов /Архарова И.А. и др. - №2019112375; заявлено 23.04.2019; Бюл. № 6. Оpubл. 26.02.2020.
5. Патент РФ 2179578, Классы МПК: C12N5/00 C12N5/06 A61N1/36. Регулятор роста клеток in vitro и способ регуляции роста клеток in vitro / Г.Ц. Дамбаев, В.Ф. Агафонников, И.А. Хлусов, Л.В. Загребин . – № 2000109887; Заявлено 17.04. 2000; Оpubл. 20.02.2002.
6. Самуйленко А. Я. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК /А. Я. Самуйленко, В.М. Попова, И.Н. Матвеева, Л.А. Скороходова // Матер. Межд. Научно – практ. Конференции. «Современные методы фильтрации в биотехнологии».- Щелково, 5 – 7 декабря, 2012. – С. 23-27.
7. Иммунология, практикум (учеб. пособие). Ковальчук Л.В. и др. Изд. «ГЭОТАР – Медиа», 2010 г., 176 Симбирцев А.С. // Цитокины и воспаление. - 2002. - Т.1, №1 – С. 9-16.
8. Современные способы выделение и культивирования клеток человека и животных: учебное пособие / Т. Д. Колокольцова, И. Н. Сабурова, А. А. Кубатиев, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия профессионального образования», - М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016. – 27-33 с.
9. Massague J. The TGF-b family of growth and differentiation factors / J. Massague // Cell. – 1987. – Vol. 49. – P. 437-438.

10. Kim S.H. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF - alpha / S.H. Kim, S.Y. Han, T. Azam et al. // *Immunity*. – 2005. – Vol. 22. - № 1. – P. 131-142.
11. Kishimoto N.T. Cytokine signal transduction / T. Kishimoto, T. Taga, S. Akira // *Cell*. – 1994. – № 76. – P. 253-262.