

Вывод: проба сердечно-дыхательного синхронизма может использоваться для объективной интегративной оценки уровня стрессоустойчивости.

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК В ВАКЦИНОЛОГИИ

Л.Л. Миронова

*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН
Москва, Россия*

Подводя итоги своей многолетней научно-практической деятельности, а также работы сотрудников лаборатории культур ткани, которую я возглавляла в течение 50 лет, четко можно выделить основные результаты. Это прежде всего успешное крупномасштабное изготовление живой полиовакцины трех типов на первичных культурах клеток почек обезьян. В процессе массового выпуска препарата были разработаны новые модификации метода трипсинизации почек, что позволило в 10-15 раз увеличить количество получаемых вакцинных культур с каждой пары почек по сравнению со стартовыми результатами [1, 2].

Особое место занимает работа по установлению новых линий перевиваемых клеток. Она потребовала много лет кропотливого труда, но результаты ее используются еще недостаточно [3]. Создан криобанк культур, в нем после вынужденной ревизии оставлено 12 линий диплоидных клеток человека, 6 линий диплоидных клеток обезьян, 6 гетероплоидных линий обезьян и по одной теленка и овцы. Приготовлены банки посевных и рабочих клеток с полным контролем на безопасность [4]. Линия диплоидных клеток кожи и мышц эмбриона человека М-22 и линия гетероплоидных клеток почек взрослой зеленой мартышки 4647 прошли национальное лицензирование в качестве вакцинных субстратов [5, 6].

19 июня 2009 г. сотрудница Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера И.Н. Лаврентьева успешно защитила докторскую диссертацию,

посвященную созданию первой **отечественной** вакцины против краснухи с использованием линии М-22 и ленинградского вакцинного штамма «Орлов-Д». ВОЗ требует осуществить 95% охват прививками подлежащего вакцинации против краснухи населения, на что Главный государственный санитарный врач РФ Г.Г. Онищенко ответил, что без отечественной краснушной вакцины этого уровня достичь невозможно. А планы прививок грандиозные: дети от 1 года до 17 лет, девушки от 18 до 25 лет, все непривитые взрослые, а также лица, получившие только одну прививку. Значит, дело за государством – организовать массовый выпуск препарата [7].

Кроме этого, тот же автор изучил вопрос репродукции вакцинных штаммов вируса кори Л-16 и эпидемического паротита Л-3 на клетках линии М-22, и теперь может идти речь о создании **отечественной триивакцины**. Это будет значительный шаг вперед, так как до сих пор вакцины против кори и эпидемического паротита в РФ производятся на первичных культурах клеток эмбрионов перепелов, а вакцину против краснухи закупают за границей.

В июне 2009 г. получено положительное решение на выдачу патента «Способ лечения ожоговой раны» с применением линии М-22. Авторский коллектив – сотрудники Института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского и нашего института.

Эпохальной в наших исследованиях является вторая лицензированная линия – 4647. Она пригодна для выпуска всех вакцин, которые в настоящее время производятся в России. По происхождению она идентична зарубежной линии Vero, которой многие отдают предпочтение. Даже инактивированную вакцину против полиомиелита, приготовленную на Vero, для России закупают во Франции. Линия 4647 установлена в 1974 г. Она названа по регистрационному номеру обезьяны, которая в виварии ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН прошла 42-дневный карантин. Из почек этого животного было приготовлено 129 1,5-литровых матрасных колб с культурой клеток, использованных в производстве живой полиовакцины Сэбина. Вакцина и контрольные культуры были обследованы на отсутствие контаминаントов. Сама линия

4647 установлена из контрольных культур, которые подверглись первому пассированию по завершении контроля на 24 сутки после эксплантации. Важно подчеркнуть, что до получения линии 4647 были пропассированы первичные культуры клеток почек 144 обезьян, также благополучно прошедших контроль. Таким образом, из 145 попыток установления линии перевиваемых клеток только одна оказалась успешной.

Клетки линии 4647 хорошо размножаются при использовании практически всех известных питательных сред с добавлением 5-10% сыворотки крупного рогатого скота, а в последнее время претендуют на 5-7% эмбриональной сыворотки. При внесении среды Игла МЕМ клетки формируют плотный слой на 2-4 сутки культивирования при кратности рассева 1:3-1:4. Урожай из однолитрового роллера составляет 80-90 млн. клеток.

В процессе работы с клетками линии 4647 они многократно подвергались замораживанию в жидком азоте. Без нарушения режима хранения материала более 80% клеток сохраняли свою жизнеспособность. Удалось, например, восстановить клетки ранних уровней пассажей через 25 лет после криоконсервирования. Также следует отметить, что после восстановления, независимо от длительности нахождения в жидком азоте, клетки не изменяли своих морфобиологических свойств. Созданы крупные банки посевных и рабочих клеток. Клетки линии 4647 проверены на безопасность и полностью удовлетворяют всем требованиям ВОЗ и национальных органов контроля к вакцинным субстратам. Важным положительным качеством линии 4647 является широкий спектр чувствительности к вирусам практически всех таксономических групп. Нами были приготовлены экспериментальные серии вакцин против полиомиелита при разных способах культивирования клеток. В качестве посевных вирусов применяли аттенуированные штаммы Сэбина I-III типов. Соответствующая документация передана в ВОЗ, где получила одобрение, но дело дальше не пошло.

Лучше дело обстояло с вакциной против чумы плотоядных. На линии 4647

был получен посевной вирус со штаммом Рокборн, приготовлены несколько экспериментальных партий вакцин, а также 10 промышленных серий вакцины – 700 тыс. доз. При первичном заражении клеток титр составил $5,0 \pm 0,2$ Ig BOE/мл. После 20 пассажей в линии 4647 титр достиг $5,5 \pm 0,2$, при адаптации вируса в первичной культуре клеток почек обезьян в аналогичных условиях через 20 пассажей титр не изменился и был равен $5,0 \pm 0,2$. Кроме этого, время накопления вируса в максимальных титрах в клетках линии 4647 было короче – 7-10 суток, а в первичной культуре – 12-16.

Вакцина против чумы плотоядных, приготовленная на клетках линии 4647, успешно прошла испытания в опытах на чувствительных животных – тхорзофrettках, отличалась высокой протективной активностью и была безопасна. Вакцина 10 серий поставлялась в зверохозяйства страны без рекламаций. В многочисленных экспериментах также была показана возможность успешного размножения в клетках линии 4647 вакцинного штамма вируса кори ЭШЧ. При этом развивались характерные для цитопатического эффекта вируса симпласты, и его титр был не ниже 5,5 Ig BOE/мл.

В нашем институте Л.Б. Эльбертом и др. были приготовлены экспериментальные серии вакцин с применением линии 4647 против клещевого и японского энцефалитов, а также желтой лихорадки. В качестве вакцинных штаммов использованы Софын, Пекин-1, 17Д соответственно. До настоящего времени вакцина против клещевого энцефалита производится на первичной культуре клеток эмбрионов кур, а против желтой лихорадки – на куриных эмбрионах. Коммерческая отечественная вакцина против японского энцефалита до сих пор в нашей стране отсутствует, а вакцина против желтой лихорадки по-прежнему производится на куриных эмбрионах.

В нашем институте Т.А. Аксеновой и др. были приготовлены на клетках линии 4647 экспериментальные серии вакцины против бешенства. В работе использован вакцинный штамм вируса Внуково-32, прошедший 35, 105, 177 серийных пасса-

жей в первичной культуре клеток почек сирийских хомяков. Титрование вируса проводили путем заражения в мозг белых мышей массой 6-7 гр. В качестве референс-препарата применяли референс-вакцину ВОЗ. Антигенную специфичность вируса определяли в реакции нейтрализации с коммерческим γ -глобулином. На первом пассаже титр вируса Внуково-32-35 был 5,5 Ig LD_{50/мл}, через 6 пассажей – 9,0 Ig LD_{50/мл} и к 18 пассажу – 9,5 Ig LD_{50/мл}. Максимальный титр штамма Внуково 32-105 к 7 пассажу составил 7,7 Ig LD_{50/мл}. Максимальный титр Внуково 32-177 к 9 пассажу равнялся 7,0 Ig LD_{50/мл}.

Варианты вируса, адаптированные к клеткам линии 4647, имели выраженную иммуногенную активность, особенно у вируса Внуково-32-35 – 22 МЕ. Клетки линии 4647 оказались более чувствительными к вакцинным штаммам вируса бешенства, чем первичные культуры клеток почек хомяков, на которых осуществляется массовый выпуск антирабической вакцины. При сравнительном изучении чувствительности клеток линии 4647 и Vero к штамму вируса бешенства Внуково-32-35 различий не наблюдалось.

Седьмой вакциной, созданной в нашем институте на клетках линии 4647, была первая в отечественной практике вакцина против гепатита А. Линия 4647 оказалась пермиссивной клеточной системой для размножения вируса гепатита А, что позволило получить значительное количество культурального вируса, достаточного для производства инактивированной вакцины в промышленных условиях. Последнее осуществлено на фирме «Вектор».

Таким образом, ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН располагает перспективными отечественными клеточными системами, пригодными для производства многих диагностических, а также лечебно-профилактических препаратов, и ждет серьезных предложений для реализации имеющегося банка линий перевиваемых клеток с заключением соответствующих договоров на поставку требуемого количества культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронова Л.Л. Культуры клеток и применение их для изготовления противовирусных препаратов: Автореф. дис. докт. мед. наук. – М., 1968. – 35 с.
2. Авторское свидетельство № 914624, 1981. Способ дезагрегации парехиматозного органа / Миронова Л.Л., Хапчаев Ю.Х., Завальный М.А., Кашликова В.И.
3. Миронова Л.Л., Хапчаев Ю.Х. Культуры клеток в вирусологических исследованиях. // В сб.: Применение культур клеток человека и животных в биотехнологии. – М., 2005. – С. 1-16.
4. Миронова Л.Л., Попова В.Д., Кононюшко О.И. и др. Опыт создания банка авторских линий перевиваемых клеток и их применение в вирусологической практике. // Биотехнология. – 2000. – №6. – С. 41-46.
5. Авторское свидетельство №1317021, 1987. Штамм диплоидных клеток кожи и мышц эмбриона человека, используемый для культивирования вирусов / Миронова Л.Л., Преображенская Н.К., Грачев В.П. и др. / Патент РФ №13137021, 1993.
6. Авторское свид-во №770195, 1980. Способ культивирования вирусов / Миронова Л.Л., Грачев В.П., Кузнецова Н.В., Попова В.Д. / Патент РФ №770195, 1993.
7. Лаврентьева И.Н. Штамм «Орлов-Д» для получения живой аттенуированной вакцины против краснухи: Автореф. дис. докт. мед. наук. – М., 2009. – 40 с.

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ЛИМФОТРОПНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У ЛИЦ СТАРШЕ 60 ЛЕТ

С.Г. Павленко, С.О. Ивановский,
Н.Л. Сычева, О.С. Набатова
ГОУ ВПО «Кубанский государственный
медицинский институт»
Краснодар, Россия

В последние годы отмечается неуклонный рост онкологической заболеваемости в целом и колоректальным раком (КР) в частности (Ammaturo C., et al., 1996; Манов Е. Н., 2003; Lyall MS, et al., 2006). Более 50% всех случаев рака выявляются у людей в возрасте 60 лет и старше (Трапезников Н. Н., и соавт., 1996; Холдин С. А., 1997; Воробьев Г. И. и соавт., 1999;