

УДК 578.7:578.825.11:578.835.17:57.085.2
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-15>



Оригинальная статья | Original article



Характеристика чувствительности новых клеточных культур животного “происхождения к вирусам *Coxsackievirus B5* и *Herpes simplex virus-1*

Ю.А. Захарова, А.В. Остапчук, В.В. Василевский✉, О.С. Федотова, Н.А. Шмелева

Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций
Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии “Вектор” Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека, ул. Летняя, д. 23, Екатеринбург, 620030,
Российская Федерация

✉ Василевский Валентин Валентинович; vasilevskiy_vv@eniivi.ru

Резюме

Расширение номенклатуры клеточных культур для вирусологии и биотехнологии повышает вероятность успешного реагирования на угрозы, связанные со вспышками известных и новых инфекционных заболеваний человека. Поиск восприимчивых к широкому спектру вирусов клеточных культур является актуальной задачей.

Цель работы: изучить чувствительность новых диплоидных клеточных культур животного происхождения (фибробласты почки и гортани плода свиньи) к вирусам *Coxsackievirus B5* (CVB5) и *Herpes simplex virus-1* (HSV-1).

Материалы и методы: клеточные культуры фибробластов почки и гортани плода здоровой свиноматки получены методом щадящей трипсинизации. Чувствительность новых клеточных культур фибробластов почки и гортани плода свиньи (ФППС и ФГПС) к указанным вирусам определяли по степени цитопатического действия (ЦПД), выраженной в процентном соотношении. Изучение инфекционной активности вируса CVB5 проводили методом ПЦР в режиме реального времени с оценкой относительной величины порогового цикла амплификации (C_t); HSV-1 – количественным титрованием вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), значение показателя выражали в 50% тканевой цитопатической дозе (ТЦД₅₀).

Результаты: получены диплоидные клеточные культуры ФППС и ФГПС. Выявлены высокая чувствительность клеток ФППС к вирусу CVB5 с ЦПД 87,5±3,3% на 3-м пассаже и удовлетворительная концентрация энтеровирусной РНК в ВСЖ, характеризующаяся значением порогового цикла на уровне 22–24 C_t . Чувствительность клеточной культуры ФППС к HSV-1 соответствовала 92,1±5,5% ЦПД, инфекционная активность – $10^{4,25}$ ТЦД₅₀/0,2 мл. У клеток ФГПС к изучаемым вирусам определены низкие показатели ЦПД и инфекционной активности.

Выводы: новая диплоидная клеточная культура ФППС с высоким уровнем ЦПД на примере вируса CVB5 штамма CB5-8100 и вируса HSV-1 штамма HSV-1/L-2 и подтвержденной чувствительностью к тестируемым вирусам имеет перспективы использования в вирусологии и биотехнологии. Клеточная культура ФГПС может быть кандидатом для тестирования других представителей CVB5 и HSV-1.

Ключевые слова: диплоидная клеточная культура животного происхождения; фибробласты почки плода свиньи; фибробласты гортани плода свиньи; *Coxsackievirus B5*; *Herpes simplex virus-1*; CVB5; HSV-1

Для цитирования: Захарова Ю.А., Остапчук А.В., Василевский В.В., Федотова О.С., Шмелева Н.А. Характеристика чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к вирусам *Coxsackievirus B5* и *Herpes simplex virus-1*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):7–15. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-15>

© Ю.А. Захарова, А.В. Остапчук, В.В. Василевский, О.С. Федотова, Н.А. Шмелева, 2023

Characterisation of new animal cell cultures' sensitivity to *Coxsackievirus B5* and *Herpes simplex virus-1*

Yu.A. Zakharova, A.V. Ostapchuk, W.W. Wasielewski✉, O.S. Fedotova, N.A. Shmeleva

Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", 23 Letnyaya St., Ekaterinburg, 620030 Russian Federation

✉ Walentin W. Wasielewski; vasilevskiy_vv@eniivi.ru

Abstract

The increase in the number of cell cultures for virology and biotechnology enhances the chances of a successful response to threats related to outbreaks of well-known and new human infectious diseases. It is a vital task to search for cell cultures sensitive to a wide spectrum of viruses.

The aim of the study was to investigate the sensitivity of new diploid animal cell cultures (fibroblasts of a foetal pig's kidneys and larynx) to *Coxsackievirus B5* (CVB5) and *Herpes simplex virus-1* (HSV-1).

Materials and methods. The cultures of porcine foetal kidney fibroblasts (PFKF) and porcine foetal larynx fibroblasts (PFLF) were derived from a foetus of a healthy pig by mild trypsinisation. The study determined the sensitivity of these new PFKF and PFLF cultures to the above-mentioned viruses by the cytopathic effect (CPE) expressed as a percentage. The infectious activity of CVB5 was studied using real-time polymerase chain reaction (PCR) with the determination of amplification cycle threshold values (C_t); that of HSV-1 was studied using quantitative titration of the virus-containing liquid (VCL). Infectious activity values were expressed as tissue culture 50% infective doses ($TCID_{50}$).

Results. The authors developed diploid PFKF and PFLF cell cultures. PFKF cells demonstrated high sensitivity to CVB5, with a CPE of $87.5 \pm 3.3\%$ after passage 3 and a satisfactory concentration of enterovirus RNA in the VCL of 22–24 C_t . The sensitivity of PFKF cells to HSV-1 corresponded to a CPE of $92.1 \pm 5.5\%$. In these cells, the infectious activity of HSV-1 corresponded to $10^{4.25} TCID_{50}/0.2$ mL. The experiments with PFLF cells showed low CPE and infectious activity values for both viruses.

Conclusions. The study demonstrated high CPE values with the CVB5 (CB5-8100) and HSV-1 (HSV-1/L-2) strains as examples and confirmed the sensitivity of the new diploid PFKF cell culture to these test viruses. Thus, the PFKF cell culture offers potential applications in virology and biotechnology and may be a candidate for testing other strains of CVB5 and HSV-1.

Key words:

diploid animal cell culture; porcine fetal kidney fibroblasts; porcine fetal larynx fibroblasts; *Coxsackievirus B5*; *Herpes simplex virus-1*; CVB5; HSV-1

For citation:

Zakharova Yu.A., Ostapchuk A.V., Wasielewski W.W., Fedotova O.S., Shmeleva N.A. Characterisation of new animal cell cultures' sensitivity to *Coxsackievirus B5* and *Herpes simplex virus-1*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):7–15. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-15>

Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции обозначила широкие масштабы экономических и социальных рисков в условиях глобализации современного мира. Для организации эффективных противоэпидемических, профилактических и лечебных мероприятий лабораторная диагностика все чаще опирается на экспресс-методы и быстрое обнаружение вирусных патогенов. Современные методы диагностики преимущественно основаны на полимеразной цепной

реакции (ПЦР), секвенировании и генной инженерии [1, 2]. Вместе с тем индикация вирусных патогенов с помощью экспресс-методов в полной мере не может заменить диагностику, основанную на работе с живой культурой клеток.

Отличительной особенностью способов выделения вирусных частиц с использованием культур клеток является возможность их детального изучения, что чрезвычайно важно для понимания биологии и эволюции патогенных биологических агентов, проведения научных эксперимен-

тов с целью разработки новых лекарственных и профилактических средств, в частности, современных противовирусных препаратов, антисептиков, дезинфектантов и вакцин [3, 4].

Оценку эффективности того или иного способа вирусологической диагностики оптимально проводить на определенные группы вирусов, характеризующихся различными механизмами действия, путями и факторами передачи и входными воротами инфекции. Для этих целей существуют определенные тест-штаммы и (или) актуальные клинические изоляты, как правило, кишечной и респираторной группы вирусных инфекций.

Активация эпидемического процесса кишечных инфекций, преимущественно норовирусной, ротавирусной и энтеровирусной (неполио) этиологии, в последние годы отмечается во всех регионах мира, включая Российскую Федерацию, что диктует необходимость создания оперативной системы их мониторинга. *Coxsackievirus B5* (CVB5) является одним из наиболее известных представителей неполиомиелитной группы энтеровирусов. Известно, что у человека заболевание, обусловленное CVB5, связано с серьезными неврологическими симптомами, в частности асептическим менингитом, реже – кардиомиопатией и диабетом [5]. Классические подходы к обнаружению и количественной оценке энтеровирусов основаны на наблюдении их цитопатического действия (ЦПД) в клеточных культурах [6]. В настоящее время отсутствует универсальная культура клеток для выделения вируса CVB5. Чаще используют культуру клеток рабдомиосаркомы человека (RD). Некоторые штаммы вируса могут быть выделены исключительно с использованием чувствительных лабораторных животных или эмбриональных клеток человека. Ввиду законодательных ограничений в Российской Федерации на использование эмбрионального материала человека, получение таких клеток серьезно ограничено¹.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) к 2016 г. вирусом герпеса человека *Herpes simplex virus-1* (HSV-1), относящимся к респираторной группе вирусных инфекций, в мире инфицированы порядка 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет (67% населения)². В настоящее время отмечается необходимость разработки улучшенных мер терапии и профилактики герпесвирусной инфекции, создание

эффективной вакцины. По данным ряда авторов, в зависимости от цели исследования чувствительными к HSV-1 являются лишь первичные клетки фибробластов куриного эмбриона (ККЭ), перевиваемые культуры клеток почек зеленой мартышки (Vero) [7] и легкие эмбриона человека (ЛЭЧ-4(81)) [8].

Таким образом, поиск новых клеточных культур человека и животных для воспроизведения вирусной инфекции в первичных и перевиваемых культурах клеток является актуальной задачей в области практической вирусологии и биотехнологии. В этом направлении проведены экспериментальные сравнительные исследования клеток человеческого и животного происхождения, в результате которых установлено, что клетки свиньи имеют сопоставимые характеристики и функциональность с человеческими, что позволяет соотносить данные исследований на клеточных культурах свиньи с данными исследований на клеточных культурах человека [9, 10]. Следовательно, получение новой клеточной культуры животного происхождения и оценка ее чувствительности с использованием актуальных вирусных изолятов кишечной и респираторной группы, CVB5 и HSV-1, весьма перспективно [11].

Цель работы – изучить чувствительность новых диплоидных клеточных культур животного происхождения (фибробласты почки и гортани плода свиньи) к вирусам CVB5 и HSV-1.

Материалы и методы

Клеточные культуры

Клеточные культуры фибробластов почки и гортани плода свиньи (ФППС и ФГПС) были получены от эмбрионов здоровой свиноматки из животноводческого хозяйства Свердловской области и использовались также в исследовании А.В. Алимова с соавт. [12]. Принципы этического кодекса «Международных рекомендаций по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» (Council for International Organisations of Medical Sciences, CIOMS)³ были соблюдены при изъятии и транспортировке матки животного.

Первично-трипсинизированные клетки фибробластов плода свиньи получали методом щадящей трипсинизации [13]. При вскрытии матки эмбрионы помещали в раствор Хенкса («ПанЭко», Россия). В последующем из них извлекали

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

² <https://www.who.int/ru/news/item/28-10-2015-globally-an-estimated-two-thirds-of-the-population-under-50-are-infected-with-herpes-simplex-virus-type-1>

³ International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. CIOMS; 1985. <https://cioms.ch/publications/product/international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals-2/>

органы (почки, гортань). Деагрегацию ткани проводили на магнитной мешалке при 37 °С с использованием 0,25% раствора трипсина с солями Хенкса и средой с 0,5% содержанием гидролизата лактальбумина («ПанЭко», Россия). Полученный материал центрифугировали при 350 г в течение 10 мин, сливали супернатант, а клеточный осадок культивировали в полной среде, состоящей из смеси питательных сред (0,5% раствор гидролизата лактальбумина и Игла MEM в соотношении 1:1 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) производства Biosera, Франция) в пластиковых флаконах с площадью культивирования 175 см² (Corning, США) по традиционной методике [14]. Из стабилизированных культур клеток готовили цитологические препараты, окрашивали гематоксилин-эозином. Кариологические исследования хромосомных пластинок проводили с использованием 0,1% раствора колхицина («ПанЭко», Россия) по методу Мурхеда [15] после четвертого пассажа.

Полученные первичные культуры ФППС и ФГПС были субкультивированы и достигли фенотипической гомогенности на третьем пассаже, их пределы культивирования составили 26 и 22 пассажа соответственно.

Вирусы

В качестве актуальных патогенов [6] использовали вирусы различных таксономических групп: неполиомиелитный энтеровирус группы В *Coxsackievirus B5* (CVB5) как представителя вирусных кишечных инфекций и вирус простого герпеса первого типа *Herpes simplex virus-1* (HSV-1) как представителя респираторных инфекций.

В эксперименте использовали штамм CB5-8100 вируса CVB5, выделенный от больного серозным менингитом на первичной культуре клеток фибробластов эмбриона человека ЛЭЧ-4(81); показатель инфекционной активности вируса, выраженный в 50% тканевой цитопатической дозе (ТЦД₅₀), составил 10⁶ ТЦД₅₀/0,2 мл. Штамм выделен в лаборатории энтеральных вирусных инфекций ЕНИИВИ ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Музейный штамм HSV-1/L-2 вируса HSV-1, полученный из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, культивировали на клетках фибробластов эмбриона человека ЛЭЧ-3; инфекционная активность вируса в вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) составила 10^{5,75} ТЦД₅₀/0,2 мл.

Видовая принадлежность обоих штаммов CB5-8100 и HSV-1/L-2 к вирусам CVB5 и HSV-1 подтверждена молекулярно-генетическим методом: полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме

реального времени с использованием набора реагентов с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Enterovirus-FL» и «АмплиСенс® HSV I, II-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора).

Учет результатов

Чувствительность клеточных культур ФППС и ФГПС к исследуемым вирусам оценивали на 10-м пассаже роста клеточной культуры, в стадии активной пролиферации. Клеточную культуру выращивали в стандартных условиях CO₂-инкубатора (с концентрацией CO₂ 5%) при 37 °С в виде монослоя в пластиковых культуральных плоскодонных пробирках (TFS, США) объемом 15 мл. Плотность посева клеток составляла 180–200 тыс. кл/мл в среде роста объемом 3,0 мл. В качестве среды роста использовали смесь питательных сред 0,5% гидролизата лактальбумина и коммерческой среды «Игла MEM» в соотношении 1:1, с добавлением 10% ФБС. Полученный клеточный монослой после отмывки от полной среды заражали дозой 200 мкл ВСЖ в среде поддержания (среда роста без ФБС) объемом 1,8 мл и инкубировали в стандартных условиях до 5 суток. В контрольную пробирку (для наблюдения клеточной культуры без вируса) после отмывки от полной среды, добавляли 2,0 мл среды поддержания (не содержащую дозы 200 мкл ВСЖ), инкубировали в тех же условиях. Визуальную оценку признаков ЦПД проводили ежедневно с 1 по 5 сут инкубации как описано ранее [12], включая округление клеток, дегенерацию монослоя, отделение от поверхности пластика. Степень ЦПД оценивали по количеству клеток (%) монослоя с характерными для воздействия вирусов изменениями по условной четырехбалльной шкале и выражали в уровне (%) ЦПД: «–» (0% ЦПД); «+» (<25% ЦПД); «++» (от 25 до 50% ЦПД); «+++» (от 50 до 75% ЦПД) и «++++» (от 75 до 100% ЦПД). При отсутствии ЦПД на 5 сут предполагали латентное размножение вируса. С целью обнаружения вируса в последующих генерациях разрушали предположительно зараженные клетки методом «замораживания–оттаивания», получали суспензию разрушенных клеток, которую использовали в качестве ВСЖ для последующих «слепых» пассажей на монослое интактных клеток. При 0% ЦПД после третьего слепого пассажа клеточную культуру считали нечувствительной к вирусу.

Для определения концентрации энтеровирусной РНК штамма CB5-8100 в ВСЖ использовали метод ПЦР в реальном времени, набор реагентов «АмплиСенс® Enterovirus-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Величина

порогового цикла амплификации (C_t) в пробах позволяет оценивать концентрацию энтеровирусной РНК. Значения C_t в пробах, не превышающие 40 циклов, были интерпретированы как положительные согласно инструкции производителя набора реагентов.

Для выявления инфекционной активности вируса HSV-1/L-2, полученного при культивировании с использованием монослоя клеточной культуры, выращенной в 96-луночных культуральных планшетах, проводили титрование ВСЖ путем десятикратного последовательного разведения (от 10^{-1} до 10^{-8}). Результаты учитывали по выявлению характерного ЦПД после совместного культивирования в течение 5 суток в условиях CO_2 -инкубатора при 37 °С. Расчет титра вируса в ВСЖ проводили по методу Спирмена–Кербера [16].

Статистическая обработка результатов

Оценку статистической значимости различий средних значений ЦПД на клеточных культурах при инфицировании клеток ФППС и ФГПС в экспериментах проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Доказательство гипотезы H_0 о несущественности различий отвергалось при $p < 0,05$. Оценку соответствия нормальному распределению осуществляли с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Доказательство гипотезы H_0 о выборке, в которой распределение соответствовало нормальному, принимали при $p > 0,05$.

Результаты и обсуждение

Клетки диплоидной клеточной культуры ФППС, характеризующиеся ориентированным ростом, морфологически были представлены как эпителиоподобные клетки с четкими границами. ФППС стабильно сохраняли модальное число хромосом в кариотипе ($2n=38$) на протяжении полного периода культивирования. Количество клеток с аномальными формами интерфазного ядра не превышало 2,1% от числа делящихся клеток. Уровень митотической активности ФППС на 3 сут роста составлял $14,0 \pm 1,0\%$.

Диплоидная клеточная культура ФГПС была представлена фибробластоподобными клетками с четкими границами. Модальное число хромосом в кариотипе ($2n=38$). Количество клеток с аномальными формами интерфазного ядра не превышало 1,7%. Уровень митотической активности клеток составлял $14,8 \pm 1,56\%$ на 3 сут роста.

Клеточные культуры исследовали на присутствие микоплазменной инфекции методом лю-

минесцентной микроскопии. Неспецифическая дегенерация монослоя клеток начиналась не ранее 10 сут, что указывало на отсутствие контаминации клеточной культуры посторонними агентами. На полученные клеточные культуры ФППС и ФГПС разработаны паспорта⁴.

Первая серия экспериментов с двумя диплоидными клеточными культурами ФППС и ФГПС состояла в изучении их чувствительности к энтеровирусу CVB5 (штамм CB5-8100). Высокая чувствительность к вирусу выявлена у ФППС на третьем пассаже (табл. 1), что характеризует эту клеточную культуру как высокочувствительную [12]. Цитопатическое действие штамма CB5-8100 вируса CVB5 на культуру ФГПС составило $37,5 \pm 4,8\%$ ЦПД, что характеризует культуру клеток как слабочувствительную.

С целью выявления репликации РНК CVB5 в исследуемых клеточных культурах определена относительная концентрация энтеровирусной РНК штамма CB5-8100 в ВСЖ, полученной в цикле «замораживания–оттаивания» проб после третьего пассажа на клеточных культурах. Полученные результаты (табл. 2) подтверждают репликацию РНК энтеровируса штамма CB5-8100 в клетках ФППС и ФГПС, при этом наибольшая относительная концентрация копий энтеровирусной РНК зарегистрирована в культуре клеток ФППС [12].

Результаты указывают на возможность использования диплоидной культуры ФППС для репродукции энтеровируса CVB5. Установлены высокие показатели цитопатического действия вируса ($87,5 \pm 3,3\%$ ЦПД), подтвержденные низкой величиной порогового цикла ($22,0–24,0 C_t$), указывающей на удовлетворительную концентрацию копий вируса при амплификации энтеровирусной РНК (1000–4000 копий в пробе 0,2 мл). Клеточная культура ФГПС показала слабую чувствительность к штамму CB5-8100 ($37,5 \pm 4,8\%$ ЦПД; $33,4–36,6 C_t$ и 1–5 копий соответственно).

Вторая серия экспериментов с клеточными культурами ФППС и ФГПС состояла в изучении их чувствительности к штамму HSV-1/L-2 герпес-вируса HSV-1. Уровень $92,1 \pm 5,5\%$ ЦПД вируса на клеточную культуру выявлен у ФППС на третьем пассаже, что характеризует эту клеточную культуру как высокочувствительную (табл. 3). Показатель цитопатического действия штамма HSV-1/L-2 на клеточной культуре ФГПС составил $45,7 \pm 5,9\%$ ЦПД и характеризует ее как слабочувствительную.

⁴ Паспорт культуры ФППС (идентификатор «20180503»). ЕНИИВИ ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Екатеринбург. Паспорт культуры ФГПС (идентификатор «20180716»). ЕНИИВИ ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Екатеринбург.

Таблица 1. Уровень цитопатического действия (ЦПД) энтеровируса CVB5 штамма CB5-8100 на культурах клеток (по А.В. Алимову с соавт. [12] с изменениями)**Table 1.** Cytopathic effect (CPE) of enterovirus CVB5 strain CB5-8100 on cell cultures (adapted from A.V. Alimov et al. [12])

Культура клеток <i>Cell culture</i>	ЦПД CB5-8100, %±m <i>CPE of CB5-8100, %±m</i>		
	1 пассаж <i>Passage 1</i>	2 пассаж <i>Passage 2</i>	3 пассаж <i>Passage 3</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine fetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	25,0±4,3	37,5±4,8	87,5±3,3
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine fetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	12,5±3,3	25±4,3	37,5±4,8

Примечание. *m* – ошибка репрезентативности. Статистически значимые различия средних значений ЦПД при инфицировании клеток ФППС и ФГПС вирусом CB5-8100 в экспериментах подтверждены с использованием *t*-критерия Стьюдента. Доказательство гипотезы H_0 о несущественных различиях отвергнута при $p=0,00001$ ($p<0,05$). Нормальное распределение данных подтверждено при $p=0,10$ для ФППС и $p=0,28$ для ФГПС (гипотеза H_0 подтверждается для $p>0,05$).

Note. *m*, selecting bias. The statistical significance of differences in mean CPE values observed in experiments with PFKF and PFLF cells infected with CB5-8100 was confirmed using Student's *t*-test. The null hypothesis (H_0) of insignificant difference was rejected at $p=0.00001$ ($p<0.05$). Normal data distribution was confirmed at $p=0.10$ for PFKF cells and $p=0.28$ for PFLF cells (H_0 is confirmed for $p>0.05$).

Таблица 2. Концентрация копий вирусной РНК в пробах энтеровируса CVB5 штамма CB5-8100 на культурах клеток (по А.В. Алимову с соавт. [12] с изменениями)**Table 2.** Concentration of viral RNA copies in the samples of enterovirus CVB5 strain CB5-8100 in cell cultures (adapted from A.V. Alimov et al. [12])

Культура клеток <i>Cell culture</i>	Проба <i>Sample</i>	C_t	Концентрация копий вирусной РНК в пробе 0,2 мл <i>Concentration of viral RNA copies in a 0.2 mL sample</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine fetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	1	24,0	1000
	2	22,0	4000
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine fetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	1	33,4	5
	2	36,6	1

Примечание. C_t – величина порогового цикла амплификации.

Note. C_t , threshold amplification cycle value.

С целью подтверждения достоверности результатов, а также выявления инфекционной активности штамма HSV-1/L-2 вируса HSV-1 проводили титрование ВСЖ после 3-го пассажа путем десятикратного последовательного разведения (от 10^{-1} до 10^{-8}) для определения показателя ТЦД₅₀ как наибольшего разведения ВСЖ, при котором вирус способен вызвать ЦПД у 50% инфицированных клеток (табл. 4).

Уровень инфекционной активности штамма HSV-1/L-2 в клетках ФППС (табл. 4) признан как удовлетворительный, а в клетках ФГПС как низкий относительно исходной инфекционной активности вируса в ВСЖ музейного штамма HSV-1/L-2, культивированного на клетках ЛЭЧ-3 ($10^{5,75}$ ТЦД₅₀/0,2 мл).

Полученные данные указывают на возможность использования диплоидной культуры ФППС для репродукции HSV-1: установлены высокие показатели цитопатического действия ($92,1\pm 5,5\%$ ЦПД) на фоне удовлетворительного уровня инфекционной активности ($10^{4,25}$ ТЦД₅₀/0,2 мл). Клеточная культура ФГПС показала слабую чув-

ствительность к штамму HSV-1/L-2 ($45,7\pm 5,9\%$ ЦПД и $10^{2,75}$ ТЦД соответственно).

Таким образом, в серии экспериментов, посвященных изучению чувствительности диплоидных клеточных культур животного происхождения (ФГПС и ФППС) к вирусам кишечной группы CVB5 и респираторной группы HSV-1, установлено, что культура клеток ФППС характеризуется удовлетворительной восприимчивостью в отношении этих вирусов, отвечает заявленным целям и будет востребована в вирусологической практике с целью выделения и изучения актуальных и наиболее распространенных на территории Российской Федерации вирусных патогенов. Клеточная культура ФГПС имела низкую чувствительность к изучаемым штаммам вирусов, однако ввиду отсутствия полной резистентности может быть кандидатом для оценки спектра чувствительности к другим представителям CVB5 и HSV-1. Клеточные культуры ФГПС и ФППС паспортизированы для вирусологического применения. Главный банк клеток культуры ФППС (56 ампул, 224 мл

Таблица 3. Уровень цитопатического действия (ЦПД) герпесвируса HSV-1 штамма HSV-1/L-2 на культурах клеток
Table 3. Cytopathic effect (CPE) of herpesvirus HSV-1 strain HSV-1/L-2 on cell cultures

Культура клеток <i>Cell culture</i>	ЦПД HSV-1/L-2, %±m <i>CPE of HSV-1/L-2, %±m</i>		
	1 пассаж <i>Passage 1</i>	2 пассаж <i>Passage 2</i>	3 пассаж <i>Passage 3</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine fetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	35,6±5,3	54,6±5,9	92,1±5,5
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine fetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	19,9±5,6	30,5±5,7	45,7±5,9

Примечание. *m* – ошибка репрезентативности. Статистически значимые различия средних значений ЦПД при инфицировании клеток ФППС и ФГПС вирусом HSV-1/L-2 в экспериментах были подтверждены с использованием *t*-критерия Стьюдента при $p=0,0001$ (гипотеза H_0 опровергнута для $p<0,05$); распределение данных выборки соответствует нормальному при $p=0,11$ для ФППС и $p=0,12$ для ФГПС (гипотеза H_0 подтверждена для $p>0,05$).

Note. *m*, selecting bias. The statistical significance of differences in mean CPE values observed in experiments with PFKF and PFLF cells infected with HSV-1/L-2 was confirmed using Student's *t*-test at $p=0.0001$ (H_0 was rejected at $p<0.05$); the sample data distribution corresponded to normal at $p=0.11$ for PFKF and $p=0.12$ for PFLF (H_0 was confirmed at $p>0.05$).

Таблица 4. Инфекционная активность герпесвируса HSV-1 штамма HSV-1/L-2 в вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), полученной при культивировании вируса на культурах клеток

Table 4. Infectious activity of herpesvirus HSV-1 strain HSV-1/L-2 in the virus-containing liquid (VCL) from virus cultivation in cell cultures

Культура клеток <i>Cell culture</i>	Инфекционная активность HSV-1/L-2 после 3 пассажа, ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>Infectious activity of HSV-1/L-2 after passage 3, TCID₅₀/0.2 ml</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine fetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	$10^{4,25}$
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine fetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	$10^{2,75}$

Примечание. ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза: наибольшее разведение ВСЖ, в которой вирус способен вызвать цитопатическое действие у 50% инфицированных клеток.

Note. TCID₅₀ (tissue cytopathic dose): the highest VCL dilution at which the virus is able to cause a cytopathic effect in 50% of the infected cells.

клеток, идентификатор «20180503») и культуры ФГПС (56 ампул, 180 млн клеток, идентификатор «20180716») депонирован в криохранилище банка-музея клеточных культур ЕНИИВИ ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора г. Екатеринбург, входящего в состав «Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения» Российской коллекции клеточных культур (РККК)⁵.

Выводы

1) Получены новые диплоидные культуры клеток ФГПС и ФППС. ФППС представляют собой эпителиоподобные клетки с четкими границами, уровнем митотической активности $14,0\pm 1,0\%$ при патологии митоза не более 2,1% от числа делящихся клеток и модальным числом хромосом в кариотипе $2n=38$. ФГПС – фибробластоподобные клетки с четкими границами, уровнем митотической активности $14,8\pm 1,56\%$ с патологией митоза

не более 1,7% и аналогичным модальным числом хромосом ($2n=38$).

- 2) Установлен высокий уровень цитопатического действия вирусов CVB5 (штамм CVB5-8100) – $87,5\pm 3,3\%$ и HSV-1 (штамм HSV-1/L-2) – $92,1\pm 5,5\%$ на клеточную культуру ФППС при более низких показателях ($37,5\pm 4,8\%$ и $45,7\pm 5,9\%$) цитопатического действия тестируемых вирусов на клеточную культуру ФГПС.
- 3) Высокая чувствительность диплоидной клеточной культуры ФППС подтверждена значительной концентрацией в ВСЖ энтеровируса CVB5 (штамм CVB5-8100) – от 1000 до 4000 копий вирусной РНК/0,2 мл и инфекционной активностью HSV-1 (штамм HSV-1/L-2) – $10^{4,25}$ ТЦД₅₀/0,2 мл. Чувствительность диплоидной клеточной культуры ФГПС к CVB5-8100 не превысила 1–5 копий вирусных РНК/0,2 мл, к HSV-1/L-2 – $10^{2,75}$ ТЦД₅₀/0,2 мл, что характеризует изучаемую культуру как слабочувствительную.

⁵ Российская коллекция клеточных культур ФБУН «Институт цитологии Российской академии наук». <https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcija-kletochnyh-kultur/>

Литература/References

- Ogilvie M. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol.* 2001;11(6):351–4. <https://doi.org/10.1002/rmv.335>
- Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):49–78. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-06>
- Genzel Y. Designing cell lines for viral vaccine production: where do we stand? *Biotechnol J.* 2015;10(5):728–40. <https://doi.org/10.1002/biot.201400388>
- Aubrit F, Perugi F, Léon A, Guéhenneux F, Champion-Arnaud P, Lahmar M, Schwamborn K. Cell substrates for the production of viral vaccines. *Vaccine.* 2015;33(44):5905–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.110>
- Chen P, Wu X, Su Y, Hao X, Mao Q, Liang Z. Development of a pseudovirus based assay for measuring neutralizing antibodies against *Coxsackievirus B5*. *J Virol Methods.* 2017;246:21–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.005>
- Dolskiy AA, Grishchenko IV, Yudkin DV. Cell cultures for virology: usability, advantages, and prospects. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7978. <https://doi.org/10.3390/ijms21217978>
- Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, Taherikalani M, Nasrolahi A, Amraei M, Ghafourian S. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect.* 2016;7(2):77–82. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>
- Глинских НП, Колесникова ГГ, Устьянцев ВП, Закирова СФ, Власова ЛВ, Станиславская ВК. Штамм диплоидных клеток легкого эмбриона человека ЛЭЧ-4(81), используемый для диагностики вирусных инфекций. Патент СССР № SU 1147748 A1; 1985. Glinskikh NP, Kolesnikova GG, Ustyantsev VP, Zakirova SF, Vlasova LV, Stanislavskaya VK. Diploid human embryo lung cell strain, LECh-4(81), for diagnosis of viral infections. Patent of the USSR No. SU 1147748 A1; 1985 (In Russ.).
- Noort WA, Oerlemans MI, Rozemuller H, Feyen D, Jaksani S, Stecher D, et al. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med.* 2012;16(8):1827–39. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01455.x>
- Schweizer R, Waldner M, Oksuz S, Zhang W, Komatsu C, Plock JA, et al. Evaluation of porcine versus human mesenchymal stromal cells from three distinct donor locations for cytototherapy. *Front Immunol.* 2020;11:826. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00826>
- Викулов ГХ. ОРВИ, грипп и герпес: что общего и в чем разница при диагностике и терапии. Взгляд клинического иммунолога и инфекциониста. РМЖ «Медицинское обозрение». 2015;23(17):1032–7. Vikulov GH. URTI, influenza and herpes: common aspects and differences in diagnosis and therapy. A clinical immunologist's and infectologist's viewpoint. *Russian Medical Journal.* 2015;23(17):1032–7 (In Russ.).
- Алимов АВ, Федотова ОС, Шмелева НА, Бахарев АА, Резайкин АВ, Усольцева ПС и др. Определение чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к клиническим изолятам энтеровируса человека Echovirus 11 и *Coxsackievirus B5*. Медицинский алфавит. 2020;(18):17–9. Alimov AV, Fedotova OS, Shmelyova NA, Bakharev AA, Rezaykin AV, Usoltseva PS, et al. Determining sensitivity of novel animal derived cell cultures to clinical isolates of human enterovirus Echovirus 11 and *Coxsackievirus B5*. *Medical alphabet.* 2020;(18):17–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-18-17-19>
- Глинских НП, Бахарев АА, Устьянцев ПВ, Устьянцев ИВ. Способ получения стабильных клеточных культур. Патент Российской Федерации № 2392318; 2008. Glinskikh NP, Bakharev AA, Ustyantsev PV, Ustyantsev IV. A method for obtaining stable cell cultures. Patent of the Russian Federation No. 2392318; 2008 (In Russ.).
- Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир; 1983. Adams RLP. Cell culture for biochemists. Amsterdam: Elsevier/North-Holland; 1980.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:613–6. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5)
- Husson-van Vliet J, Roussel P. Pipetting errors in viral titrations: a useful approach. *J Virol Methods.* 1988;22(2–3):183–90. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(88\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(88)90101-2)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Ю.А. Захарова** — общее руководство, концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **А.В. Остапчук** — экспериментальные исследования, написание текста рукописи; **В.В. Василевский** — написание и оформление текста рукописи; **О.С. Федотова** — дизайн работы, экспериментальные исследования; **Н.А. Шмелева** — экспериментальные исследования.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **Yu.A. Zakharova** supervised the research, conceptualised the study, and approved the final version of the manuscript for publication. **A.V. Ostapchuk** conducted the experiments and drafted the manuscript. **W.W. Wasielewski** drafted and formatted the manuscript. **O.S. Fedotova** designed the study and conducted the experiments. **N.A. Shmeleva** conducted the experiments.

Соответствие принципам этики. Исследование проводилось в соответствии с принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных».

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Ethics approval. The study complied with International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals by the Council for International Organisations of Medical Sciences, CIOMS.

Acknowledgements. The study was conducted without sponsorship.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Захарова Юлия Александровна, д-р мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>
zakharova_ya@eniivi.ru

Остапчук Анна Владимировна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8157-6866>
ostapchuk_av@eniivi.ru

Василевский Валентин Валентинович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-2184>
vasilevskiy_vv@eniivi.ru

Федотова Ольга Семеновна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1928-8211>
fedotova_os@eniivi.ru

Шмелева Наталья Анатольевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8922-0792>
shmeleva_na@eniivi.ru

Yulia A. Zakharova, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>
zakharova_ya@eniivi.ru

Anna V. Ostapchuk. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8157-6866>
ostapchuk_av@eniivi.ru

Walentin W. Wasielewski. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-2184>
vasilevskiy_vv@eniivi.ru

Olga S. Fedotova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1928-8211>
fedotova_os@eniivi.ru

Natalya A. Shmeleva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8922-0792>
shmeleva_na@eniivi.ru

Поступила 30.05.2022

После доработки 16.01.2023

Принята к публикации

Received 30 May 2022

Revised 16 January 2023

Accepted