присутствие антител в диагностическом титре к вирусам Коксаки В в РНГА и методом иммуноферментного анализа к ДНК – содержащим возбудителям.

Наибольшим разнообразием отличался спектр антител в группе детей 2 – 3 и 3 – 6 лет. Смешанное инфицирование определяли в 74% случаев при наличии диагностического титра вирусспецифических антител к вирусам Коксаки. Если присутствие у иммунокомпрометированных детей герпесвирусного инфицирования (ЦМВ, ЭБВ, ВПГ) было вполне ожидаемым, то выявление антител к такому возбудителю как Chamydophila pneumoniae – неожиданным. Однако в настоящее время имеется ряд публикаций о том, что Chamydophila pneumoniae может вызывать не только поражения респираторного тракта, но также менингоэнцефалит, паралитический синдром Гийена-Барре, реактивный артрит, миокардит.

Понимание необходимости создания системы эпидемиологического надзора за энтеровирусными заболеваниями, вызванными неполиомиелитными энтеровирусами, существует на уровне руководителей санэпидслужбы и здравоохранения. Имеется соответствующая, но отдельно не финансируемая Программа РФ «Эпидемиологический надзор и профилактика (неполио) энтеровирусной инфекции на 2009 – 2011 гг.».

Однако только при наличии финансирования, необходимого для обеспечения новых разработок, и привлечения молодых кадров можно надеяться на получение новых знаний и внедрения их на практике.

ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ЛАБОРАТОРИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ЕКАТЕРИНБУРГСКОГО НИИВИ

Н.П. Глинских, А.А. Бахарев

ФГУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург

Лаборатория культивирования тканей (в настоящее время - лаборатория клеточных культур) образована в составе института в 1958 году, в период реорганизации Института эпидемиологии и микробиологии в Институт полиомиелита, на базе которого предполагалось осуществлять производство вакцины по профилактике полиомиелита, столь необходимой в тот период. Однако эта задача была успешно решена за счет расширения производства в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. Поэтому вся работа лаборатории была направлена на обеспечение клеточными культурами диагностических исследований полиомиелита и полиомиелитоподобных заболеваний. В последующем – по мере формирования с 1960 года Института вирусных инфекций, стали развиваться исследования по разработке препаратов для диагностики адено-, парагриппа-, репираторно-синцитиальной, гриппозной, коревой инфекций. Сформировалось направление по диагностике и профилактике клещевого энцефалита и других трансмиссивных вирусных инфекций. Все эти исследования требовали развитой службы клеточных культур, тем более что с 1966

года Институт осуществлял деятельность как головной по проблеме "вирусология и вирусные заболевания" в системе Минздрава РСФСР.

Соответственно новым задачам, основные научные исследования были направлены на отработку условий стабилизации морфологических и культуральных свойств культур, их характеристику и повышение чувствительности к вирусам. В это время были отработаны основные методы культивирования и паспортизации клеток, а также их транспортировки на дальние расстояния. В 1970 году в лаборатории усилиями сотрудников было положено начало созданию низкотемпературного банка – музея клеточных культур, позволявшего обеспечить сохранность культур клеток в исходном состоянии в течение многих лет. Первоначальная коллекция состояла всего из 6 культур. В настоящее время она включает более 70 клеточных линий и штаммов, из которых более половины паспортизированы согласно требованиям Всероссийской специализированной коллекции клеточных культур (ВСКК) и внесены в соответствующие каталоги, вплоть до европейских. В связи этим появилось и новое направление в работе, крайне необходимое в то время и не утратившее актуальности и в настоящее время - уточнение характеристик и паспортизация клеточных культур.

С появлением криобанка клеточных культур собственно лаборатория превратилась фактически в "службу клеточных культур". На ее базе была впервые разработана и успешно функционировала система централизованного обеспечения клеточными культурами практических вирусологических лабораторий не только РСФСР, но и Советского Союза, а также многих научных учреждений. География поставок включала более 100 адресов. В основу работы были положены методики транспортирования и восстановления клеточных культур, разработанные в институте. Банк-музей клеточных культур, функционирующий на базе лаборатории в соответствии с письмом МЗ РСФСР № 9б/1328нп от 16.05.1976 г., получил статус Республиканского. Лаборатория клеточных культур продолжает обеспечивать проведение исследований по получению и паспортизации клеточных культур, стандартизации условий их культивирования и разработке новых питательных сред, изучению процессов взаимодействия в системе среда–клетка. Выполняются научные работы по криоконсервации культур, по созданию фонда клеток для проведения разноплановых вирусологических исследований. Клеточными культурами обеспечиваются научные исследования, выполняемые по планам НИР института, расширяется коллекция фонда клеточных культур, как основа Республиканского банка-музея и производственных фондов.

Помимо работ по обеспечению клеточными культурами вирусологических исследований, в лаборатории изучались актуальные проблемы определения проблем криоконсервации клеток, по определению выживаемости и восстановления клеточных культур в процессе криоконсервации. Результаты этих исследований показали стабильность свойств замороженных клеток в течение длительного времени.

Отдельным направлением необходимо выделить большую работу, проведенную в лаборатории по получению и стабилизации новых диплоидных штаммов и линий клеток. В рассматриваемый период было получено около 20 таких авторских штаммов.

В это же время в лаборатории проводились исследования по изучению процессов взаимодействия вирусов и клеток.

В 90-х годах были начаты исследования по отработке условий использования клеточных культур для определения токсичности различных материалов и объектов внешней среды, которые вылились в довольно широкие экологические исследования качества питьевых вод Урала, эффективности методов их очистки, оценки уровней воздействия на клетки неконтролируемых органических и металло-органических загрязнителей. Были проведены также исследования взаимодействия загрязнителей объектов внешней среды с некоторыми вирусами, и на модели клеточных культур показано значительное ускорение развития вирусной инфекции в условиях экологического неблагополучия.

Совершенно новый этап работы лаборатории начался с 1998 года, когда по просьбе врачей-практиков и при поддержке Облздрава Свердловской области и Управления здравоохранения г. Екатеринбурга была разработана и осуществлена Программа по внедрению биомедицинских технологий в практическое здравоохранение. Применение культур клеток для терапевтических целей в настоящее время вызывает немало споров. Наиболее известно лечение различных заболеваний стволовыми клетками, где введенные донорские клетки приживаются, дифференцируются в соответствующие тканевые структуры и размножаются в организме пациента, замещая поврежденные ткани. Наиболее яркий тому пример - пересадка клеток костного мозга при лейкемии. Опубликованы также многочисленные работы по использованию для клеточной терапии культивированных стволовых клеток различного происхождения – эмбриональных, костного мозга, пуповинной крови и пуповины.

Основным возражением ряда ученых против применения стволовых клеток является опасение возможности их неконтролируемого роста в организме реципиента и дальнейшей трансформации. В меньшей степени рассматривается возможность внесения инфицированного материала.

В нашей работе используется авторский штамм диплоидных клеток ЛЭЧ-4 (81). Штамм зарегистрирован в ВСКК, защищен авторским свидетельством и патентами. Клетки получены в 1981 году в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ Н.П. Глинских, Г.Г. Колесниковой и др., из легочной ткани 12-ти недельного эмбриона (травматический выкидыш), от здоровой женщины, не имеющей в генеалогии злокачественных или наследственных заболеваний (Авт. свид.3545014/28-13). До начала анализа клетки прошли не более 20 пассажей. Видовая принадлежность: (человек), подтверждена кариологически и изоэнзимным методом. Культура сохраняется в жидком азоте в среде роста с добавлением глицерина. При размораживании восстанавливается не менее 70 % клеток. В работе используется культура 5- 25 пассажа.

Препарат представляет собой монослой клеток (на стекле, культуральном пластике или других носителях), покрытый прозрачной или слегка опалесцирующей питательной средой красно-оранжевого цвета.

Клетки диплоидной клеточной культуры отличаются от стволовых отсутствием ряда поверхностных маркеров. Более того, проведенное исследование (к сожалению, одиночное) показало, что, в «стандартной процедуре идентификации личности» ДНК донора не определялась в организме реципиента ни на одной из стадий лечения. Из этого следует, что диплоидные клетки, вероятно, имеют механизм действия отличный от такового стволовых клеток.

Доклинические исследования эффективности и безопасности препарата "Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии" были проведены в лаборатории клеточных культур нашего института, на кафедре терапевтической стоматологии Уральской государственной медицинской академии, в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина (РОНЦ Российской академии медицинских наук), Филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России - ЦВТП БЗ» и специалистами ветслужбы на базе питомника служебных собак учреждения ИЗ-66/1 ГУвСИН РФ по Свердловской области. Все исследования выполнены в соответствии с требованиями соответствующих нормативных документов Минздравсоцразвития РФ. Испытания были проведены на мышах, хомячках, крысах, морских свинках и кроликах. Ввиду того, что аналоги для сравнения препарата отсутствуют, дополнительно были проведены исследования «хронической» токсичности клеточной культуры на собаках.

Прежде всего, препарат был испытан на туморогенную активность в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН на линии мышей BALB/C (nude). При введении 1 млн. клеток выявлено отсутствие каких-либо клинических или морфологических признаков опухолевого роста, как в месте введения препарата, так и в критических органах: регионарных лимфатических узлах и легких. При введении аналогичным мышам клеток контрольной линии А-549 у большинства животных наблюдали стандартный рост раковых опухолей, подтвержденный гистологически.

Фармакологическую активность препарата "Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии" определяли тремя методами:

1. Методом оценки формирования монослоя клеток на стекле (по ФСП).
2. По реакции регенерации повреждённых кожных покровов белой крысы на экспериментальной модели ожога.
3. По реакции регенерации тканей пародонтального комплекса на экспериментальной модели пародонтита у белых крыс Вистар.

Результат исследования трёх серий препарата (07-03;07-04 и 07-05) подтвердил хорошую специфическую активность - монослой клеток на стекле формировался на 3-4 сутки роста.

Все испытанные дозировки препарата показали отчетливо выраженный терапевтический эффект: начальные этапы эпителизации наступали уже на следующие сутки в опыте и на 3-4 сутки в контроле. Полная эпителизация ран при использовании клеток наступала на 3-4 сутки в опыте и на 6-7 сутки в контроле.

Учитывая важное научное и практическое значение применения клеточной культуры в комплексном лечении пародонтита, были проведены экспериментальные исследования на животных с целью изучения процессов регенерации при использовании различных остеопластических препаратов, способствующих направленному остеогенезу и стимуляции восстановительных процессов в тканях пародонта.

Наблюдаемые эффекты действия композиции на основе клеточной культуры и остеопластического препарата на процессы регенерации тканей пародонта у экспериментальных животных убедительно доказали ее выраженное стимулирующее воздействие, что обусловлено высокой терапевтической эффективностью клеточной культуры: активацией аллофибробластами белкового синтеза, выделением факторов роста и усилением регенерации тканей. Механизмы действия клеточной культуры на регенерацию тканей пародонта обусловлены рядом эффектов, определяемых аллофибробластами в тканях пародонта. Во-первых, аллофибробласты, внесённые в раневой дефект, являются источником проколлагена, что способствует формированию экстрацеллюлярного матрикса. Во - вторых, культивированные фибробласты, внесенные в рану, выделяя основной фактор роста фибробластов, способствуют активации ангиогенеза, чего не обеспечивает ни один из синтетических материалов.

В острых и хронических экспериментах на мышах, белых крысах, морских свинках и кроликах проведено изучение общетоксических и органотропных свойств препарата «Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии». При введении препарата беспородным белым мышам было показано, что его терапевтические дозы способствуют комплексному повышению активности интерлейкинов и ростовых факторов, обеспечивающих ход конструктивного процесса в организме, отрицательные же реакции наступают лишь при превышении терапевтических доз в несколько сот раз.

Препарат не оказывает сенсибилизирующего действия на макроорганизм, т.к. уровень IgE во всех группах подопытных животных оставался близким к значениям величин в контрольной группе животных.

Изучение свойств препарата в опытах на морских свинках и кроликах, проведенное в условиях введения препарата внутримышечно и накожных аппликаций, подтвердило, что он не вызывает развития реакции гиперчувствительности немедленного или замедленного типа.

Исследование картины периферической крови не обнаружило каких-либо существенных изменений в количестве гемоглобина, эритроцитов.

Проведенные доклинические испытания показали выраженное позитивное действие препарата на большинстве экспериментальных животных. Однако маловероятно, что клетки человека смогли бы прижиться и размножаться в организме, например, крысы. На этом основании можно сделать вывод, что основным действующим началом в препарате являются ростовые факторы и цитокины, тем более что имеется ряд публикаций, указывающих на повышенное выделение культивированными клетками ростовых факторов. Проведенные нами исследования в значительной мере подтвердили этот факт. Содержание

некоторых ростовых факторов и цитокинов в ростовой среде может до 500 раз превышать среднюю норму в крови человека.

Основным недостатком препарата на основе живых клеток является очень малый срок годности- всего 7 суток с момента его изготовления.

В настоящее время проходят испытания новые лекарственные формы препарата с большим сроком годности - до 1 года и не содержащие живой ДНК. Исследования на животных подтвердили его безопасность и высокую эффективность. Более того, препарат при испытаниях на животных проявил достаточно высокую противовирусную (противогерпетическую) активность, что требует дополнительного изучения.

Среди научно-исследовательских задач лаборатории на последующие годы определены перспективы разработки новых форм лекарственных препаратов и создания новых клеточных культур для вирусологии и биотехнологии.

В заключение необходимо отметить высокий творческий потенциал, проявленный сотрудниками лаборатории. Были выполнены и успешно защищены работы на соискание ученой степени кандидата наук Ф.Я. Зусман, Г.Г. Колесниковой, С.Г. Курумчиной, Т.И.Дроздовой, Л.Г. Тихомировой, В.Н. Авдеевой, О.Ю. Гоголевой, Л.В. Пономаревой, А.А. Бахаревым.

У истоков создания лаборатории стояли кандидаты наук Иван Иванович Воинов, Николай Петрович Плотников, Людмила Николаевна Астахова. В 1969-1989 гг. руководителем лаборатории была доктор медицинских наук Нина Поликарповна Глинских, 1989-1996 гг. кандидат биологических наук Галина Григорьевна Колесникова, с 1996 года лабораторию возглавляет кандидат биологических наук Алексей Анатольевич Бахарев.